

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
DIMITRI CARRABIN

DÉTECTION ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRES DE POPULATIONS
CYANOBACTÉRIENNES PRODUCTRICES DE MICROCYSTINES AU QUÉBEC

JANVIER 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier Marc Sirois de m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis d'entreprendre et de poursuivre mes travaux de recherche en génomique bactérienne. Je lui exprime également toute ma reconnaissance pour son initiation aux techniques de biologie moléculaire.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire Annet Lavallée, Marie-Edith Nepveu-Traversy, Pascal Auger, Élisabeth Catão et Carlos Eduardo Dulcey pour leur soutien et leur aide au laboratoire.

Je voudrais enfin remercier Sophie Parent, Valérie Leblanc et Matthieu Dufresne, pour leur aide dans mes travaux, pour leur patience et pour leur générosité tout au long de ma maîtrise.

J'exprime toute ma gratitude aux membres des laboratoires du CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec, du Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs) pour leur collaboration indispensable dans ce projet.

Je voudrais finalement exprimer ma reconnaissance aux professeurs Céline Van Themsche, Eric Asselin, et à l'ensemble des membres du GROEM (Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaire) pour le soutien intellectuel et financier dont ils m'ont gratifié.

RÉSUMÉ

Les cyanobactéries sont largement répandues dans la nature, et les floraisons cyanobactériennes sont, dans le monde entier et depuis plusieurs années, un phénomène fréquent. Les populations cyanobactériennes composant ces floraisons produisent une grande variété de métabolites secondaires, dont des cyanotoxines. Les microcystines (MCYST), les plus communes des cyanotoxines, sont également hautement toxiques pour de nombreux organismes eucaryotes. La libération de microcystines dans l'eau peut donc avoir des implications majeures sur la santé publique. À une échelle mondiale, la synthèse des microcystines est principalement due aux genres *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix*. Nous faisons l'hypothèse qu'une analyse basée premièrement sur une détection PCR du gène *mcyE* et deuxièmement sur une identification moléculaire par séquençage des amplifications PCR, validée par la détection de marqueurs RFLP dans le gène *mcyE* serait efficace et pertinente pour la détection et l'identification de cyanobactéries productrices de microcystines. En effet, dans notre étude, nous proposons d'identifier plus rapidement et de façon plus complète les cyanobactéries productrices de microcystines par l'analyse de leur génome. Plus spécifiquement, nous proposons une identification moléculaire de ces cyanobactéries basée sur le ciblage de *mcyE*, un gène conservé et existant uniquement chez celles-ci, codant pour McyE, une enzyme indispensable à la synthèse des microcystines. Dans le but de, tout d'abord, déterminer si les analyses PCR (Polymerase Chain Reaction) pourraient être une technique sensible et rapide pour détecter les cyanobactéries productrices de microcystines dans les échantillons d'eau; et dans un second temps, d'identifier le genre des producteurs de microcystines, nous avons étudié des échantillons d'eau provenant de 17 lacs du Québec dont la plupart ont été positifs aux dosages des microcystines. Les amplifications PCR ont été faites en utilisant des amorces universelles ciblant le gène *mcyE*, générant alors un fragment de 809 ou de 812 pb dépendamment du genre cyanobactérien ciblé. Pour chacun des échantillons, les amplicons PCR ont été clonés dans le vecteur pGEM-T et jusqu'à 10 inserts par échantillon ont été séquencés. Les données nucléotidiques obtenues après séquençage ont été analysées en utilisant le programme BLAST (NCBI).

Les analyses informatiques ont indiqué que deux des trois producteurs communs de microcystines (*Microcystis* sp. et *Planktothrix* sp.) étaient responsables de la catalyse des microcystines. Bien que des populations du genre *Anabaena* soient fréquemment rencontrées dans les échantillons de lacs québécois, elles n'ont jamais été moléculairement identifiées « productrices de microcystines ». Les analyses RFLP effectuées grâce aux enzymes de restriction EcoRV et BsgI à partir des réactions PCR ciblant le gène *mcyE* ont permis l'identification des deux mêmes producteurs de microcystines. Dans l'ensemble, les résultats de nos analyses moléculaires ont révélé que l'anticipation de la production de microcystines était réalisable par détection du gène *mcyE*, et que la production de microcystines dans les lacs du Québec analysés était majoritairement causée par le genre *Microcystis* et, dans une moindre mesure, par le genre *Planktothrix*. Au final, le développement de ces outils moléculaires permet un meilleur contrôle des eaux du Québec.

Mots clés : Cyanobactérie, PCR, RFLP, microcystine, *mcyE*, Québec, *Microcystis*, *Anabaena*, *Plankthotrix*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
 CHAPITRE 1	
INTRODUCTION AUX CYANOBACTÉRIES	1
1.1 Description générale des cyanobactéries	1
1.1.1 Apparition des cyanobactéries	1
1.1.2 Classification de l'embranchement cyanobacteria	1
1.1.3 Organisation cellulaire	3
1.1.4 Métabolisme.....	5
1.1.4.1 Photosynthèse	5
1.1.4.2 Mode nutritionnel	5
1.1.5 Écologie	6
1.1.5.1 Une bactérie ubiquitaire.....	6
1.1.5.2 Symbioses	6
1.2 Prolifération massives : les floraisons cyanobactériennes.....	7
1.2.1 Le phénomène de l'eutrophisation.....	7
1.2.2 Domination du milieu eutrophe par les cyanobactéries	7
1.2.3 Conséquences sur l'environnement	8
1.2.4 Les floraisons cyanobactériennes dans les lacs du Québec	9
1.3 Les cyanobactéries, des productrices de toxines	10
1.3.1 Généralités	10
1.3.2 Types de cyanotoxines et cyanobactéries productrices	11
1.3.2.1 Les composés cyanobactériens bioactifs ou cytotoxines.....	11
1.3.2.2 Les biotoxines.....	12
1.4 Cyanobactéries toxigènes identifiées dans les lacs du Québec	15

CHAPITRE 2	
LES MICROCYSTINES	17
2.1 Introduction aux microcystines.....	17
2.1.1 Généralités	17
2.1.2 Isoformes	18
2.2 Origine des microcystines dans les eaux de lacs	18
2.2.1 Régulation de la production de microcystines.....	18
2.2.1.1 Paramètres environnementaux.....	18
2.2.1.2 Phase de croissance cellulaire.....	19
2.2.2 Relâche de microcystines dans le milieu	20
2.3 Toxicité des microcystines	20
2.3.1 Voies de contamination par les microcystines.....	20
2.3.1.1 Contamination directe.....	20
2.3.1.2 Contamination indirecte.....	21
2.3.2 Structure moléculaire des microcystines : une affinité pour les protéines phosphatases hépatocytaires.....	21
2.3.3 Toxicodynamique des microcystines sur les hépatocytes.....	22
2.3.3.1 Exposition aiguë aux microcystines (fortes doses).....	22
2.3.3.2 Exposition chronique aux microcystines (faibles doses).....	23
2.4 Les microcystines dans les lacs du Québec	24
2.4.1 Méthode de détection des microcystines	24
2.4.2 Détection des microcystines dans les lacs du Québec, entre les années 2001 et 2006.....	24
2.4.3 Vers un meilleur criblage des populations productrices de microcystines	26
CHAPITRE 3	
OPERON DE LA MICROCYSTINE SYNTHETASE (MCY)	28
3.1 Biosynthèse des microcystines : une catalyse non ribosomale.....	28
3.1.1 Preuve de cette synthèse non ribosomale	28
3.1.2 Fonctionnement général des PKS et des NRPS.....	28
3.1.3 Catalyse des microcystines : cas de la MCYST-LR chez <i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i> PCC7806.....	30

3.2	Base génétique de la production de microcystines	32
3.2.1	Organisation des gènes <i>mcy</i> dans le génome des genres <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> et <i>Anabaena</i>	32
3.2.2	Contrôle génétique de la catalyse des microcystines	33
3.2.2.1	La régulation de l'expression des gènes impliqués dans la formation des microcystines	33
3.2.2.2	Variabilité génétique : à l'origine d'isoformes de microcystines	35
3.2.3	Évolution temporelle des gènes <i>mcy</i>	36
3.2.3.1	Origine des gènes <i>mcy</i> présents chez les cyanobactéries toxigènes	36
3.2.3.2	Transition naturelle des populations cyanobactériennes vers un état non toxique	37
3.2.3.3	Hypothèses des fonctions premières des microcystines	38
3.3	Identification moléculaire à partir de gènes <i>mcy</i>	40
3.3.1	Principe de l'identification moléculaire	40
3.3.1.1	Introduction à l'identification moléculaire des bactéries	40
3.3.1.2	Identification moléculaire des cyanobactéries	41
3.3.1.3	Identification moléculaire des cyanobactéries toxigènes	41
3.3.2	Le gène <i>mcyE</i> : un gène adapté à la détection et à l'identification des cyanobactéries toxigènes	42
3.4	Détection et identification moléculaire des cyanobactéries productrices de microcystines dans les lacs du Québec	44

CHAPITRE 4

DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICROCYSTIN PRODUCING CYANOBACTERIA IN QUEBEC'S LAKES BY *mcyE* GENE PCR.....47

4.1	Summary and List of Abbreviations	48
4.2	Introduction	49
4.3	Materials and methods	51
4.4	Results	54
4.4.1	Detection of potentially microcystins producer cyanobacteria	54
4.4.2	Identification of microcystin producers community among the genera <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> and <i>Planktothrix</i>	55
4.5	Discussion	57

4.5.1	Detection of toxinogenic cyanobacteria (microcystins producers).....	57
4.5.2	Identification of toxins producers	59
4.5.3	Identification of cyanobacterial community in Quebec lakes	60
4.6	Acknowledgments	61
4.7	References.....	62
4.8	Tables.....	65
4.9	Figures	68
 CHAPITRE 5		
CONCLUSION GÉNÉRALE		70
5.1	Détection des cyanobactéries productrices de microcystines	71
5.2	Identification des cyanobactéries productrices de microcystines.....	72
5.3	Poursuite de projet	76
5.3.1	Étude des populations du genre <i>Anabaena</i> dans les lacs du Québec.....	76
5.3.2	Élargissement des cyanotoxines visées : détection moléculaire des producteurs de saxitoxines, de cylindrospermopsines et des anatoxines	77
 BIBLIOGRAPHIE.....		79
 ANNEXE		
CARTE DU GÈNE <i>mcyE</i>		90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les groupes de cyanobactéries (Prescott, 2003).....	3
1.2 Cytotoxines, mode d'action et genre cyanobactérien producteur (Jaiswal, 2008).....	12
1.3 Les principales cyanotoxines et cyanobactéries productrices	13
1.4 Présence d'espèces cyanobactériennes connus pour produire des cyanotoxines dans sept stations de production d'eau potable sélectionnées au Québec. Analyses faites par microscopie (Robert et al., 2008).....	16
2.1 Fréquence de détection des microcystines dans les échantillons d'eau non traitée, prélevés entre 2001 et 2006 (Robert et al., 2008).....	25
2.2 Comparaison entre la détection des microcystines et la détection d'espèces cyanobactériennes toxigènes (Robert et al., 2008).....	26
4.1 Primer pair tageting the cyanobacterial <i>16SrDNA</i> gene and the <i>mcyE</i> gene.....	52
4.2 Microscopical observation and comparison between the concentrations of three microcystins isoforms versus the molecular identification based on sequencing BLAST analysis of the <i>mcyE</i> clones	65
4.3 In silico study. Restriction sites and their position on the DNA sequence limited by the <i>mcyE</i> -F2/ <i>mcyE</i> -R4 primers.....	66
4.4 Cyanobacterial genera observed by microscopy versus cyanobacterial genera identified by RFLP analysis of <i>mcyE</i> -F2/ <i>mcyE</i> -R4 PCR amplicons.....	67

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Classification des procaryotes photosynthétiques, dont font partie les cyanobactéries (Prescott, 2003)	2
1.2 Structure d'une cellule de cyanobactérie (Prescott et al., 2003).....	4
1.3 Conséquences associées à la formation de fleurs d'eau cyanobactériennes (Havens, 2008).....	8
1.4 Plans d'eau touchés par une fleur d'eau d'algues bleu-vert en 2008 (Robert, 2008).....	10
2.1 Structure générale des microcystines (Chorus et Bartram, 1999)	17
3.1 (a) Biosynthèse de la fraction Adda des microcystines. (b) Suite et fin de la biosynthèse de la microcystine-LR (Tillett et al., 2000).....	31
3.2 Organisation des gènes <i>mcy</i> des genres cyanobactérien <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> et <i>Planktothrix</i> (Dittman et al., 2005).....	33
3.3 Complexe enzymatique McyE (Tillett et al., 2000)	43
4.1 Phylogenetic tree type Neighbor-joining showing the relationship between the three microcystins producers: <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> and <i>Plankthotrix</i> genera.....	68
4.2 Theoretical restriction profiles obtained after alignment of sequences from the <i>mcyE</i> gene	69
4.3 RFLP analysis of <i>mcyE</i> -F2/ <i>mcyE</i> -R4 PCR amplicons	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
μM	Micromoles par litre
μg	Microgrammes
mL	Millilitre
μL	Microlitre
MCYST	Microcystine
LR	Leucine-arginine
YR	Tyrosine-arginine
RR	Arginine-arginine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
PCR	Polymerisation Chain Reaction
T _m	Température de fusion
pb	Paire de base
<i>mcy</i>	Ensemble des gènes codant pour les microcystines synthétases
McyE	Microcystine synthétase E
MDDEP	Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs
CEAEQ	Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec
PKS	Polykétide synthétase
NRPS	Non ribosomale peptide synthétase
PP1, PP2A	Protéine phosphatase 1 et 2A
AMT	Aminotransferase
AT	Acyltransferase
KS	β-ketoacyl synthase
ACP	Acyl carrier protein
KR	Ketoacyl reductase,
DH	Dehydratase
CM	C-methyltransferase
OM	O-methyltransferase

NM	(N-methyltransferase)
RC	Racemase
A	Aminoacyl adenylation
C	Condensation
Ep	Epimerisation
TE	Thioesterase

CHAPITRE 1

INTRODUCTION AUX CYANOBACTÉRIES

1.1 Description générale des cyanobactéries

1.1.1 Apparition des cyanobactéries

Les cyanobactéries, ou algues bleu-vert, font partie des plus vieux organismes apparus sur terre. Cependant, la datation des premiers fossiles cyanobactériens est sujette à controverse. Selon les premières datations, les cyanobactéries seraient apparues il y a plus de 3 milliards d'années (Fay, 1983), tandis que des publications plus récentes indiquent que leur apparition s'est faite il y a 2,7 milliards d'années (Lee, 2008). On peut cependant affirmer que l'apparition massive d'oxygène (O₂) dans l'atmosphère a eu lieu il y a 2,4 milliards d'années, grâce à l'activité photosynthétique de cyanobactéries primitives (Falkowski et Knoll, 2007).

1.1.2 Classification de l'embranchement cyanobacteria

Les cyanobactéries ont été considérées pendant plus de 150 ans comme des algues eucaryotes. Ce sont les travaux de Gibbon et Murray (1978) et de Stanier et al. (1962) qui ont permis leur intégration dans le règne des procaryotes (Neilan, 2002). Les cyanobactéries forment même une classe à part au sein de l'embranchement des eubactéries (Castenholz, 2001). Plus précisément, les cyanobactéries font partie du groupe des procaryotes photosynthétiques, mais se distinguent des bactéries vertes et pourpres (bactéries sulfureuses, photosynthèse anoxygénique) par leur photosynthèse de type oxygénique (Figure 1.1) (Castenholz, 2001; Prescott, 2003). En fait, les cyanobactéries sont, à ce jour, les seules représentantes du groupe des bactéries photosynthétiques oxygéniques (Castenholz, 2001; Prescott, 2003).

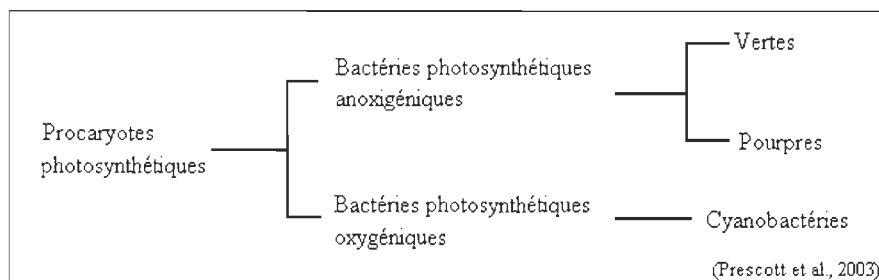


Figure 1.1 : Classification des procaryotes photosynthétiques, dont font partie les cyanobactéries (Prescott, 2003)

On dénombre environ 150 genres et 2000 espèces de cyanobactéries (Reviers, 2003). Une reclassification au sein du groupe des cyanobactéries est actuellement en cours (Castenholz, 2001; Reviers, 2003; Lee, 2008), et des noms de genres communs comme *Oscillatoria* ou *Pseudoanabaena* pourraient être divisés en nouveaux genres (Castenholz, 2001). Les classifications moléculaires basées sur l'*ADNr16S* sont encore assez controversées et les informations ne sont pas suffisantes pour délimiter infailliblement l'embranchement des cyanobactéries (Castenholz, 2001). Il a d'ailleurs été observé qu'il existait peu de points communs entre les classifications basées sur des caractères morphologiques et celles basées sur des données moléculaires (Lee, 2008). Jusqu'à présent, la classification des cyanobactéries s'appuyant sur les cinq ordres (I-V) (Tableau 1.1), une classification réalisée à partir d'observations (morphologie et mode de reproduction), sert encore de référence (Prescott, 2003). En ce qui regarde à la morphologie, trois principaux types d'organisation cellulaire plus ou moins complexes peuvent être observées par microscopie : unicellulaire, filaments ou trichomes non ramifiés, ou finalement filaments ou trichomes ramifiés ou composés de plusieurs rangés de cellules (Tableau 1.1). Les cyanobactéries ont la capacité de bourgeonner soit par scission binaire ou encore par division multiple (Tableau 1.1).

Tableau 1.1
Les groupes de cyanobactéries (Prescott, 2003)

Ordre	Forme générale	Reproduction et croissance	Mole % GC	Autres propriétés	Genres représentatifs
I	Bâtonnets ou coques unicellulaires ; agrégats non filamenteux	Scission binaire, bourgeonnement	31-71	Presque toujours non mobiles	<i>Chamaesiphon</i> <i>Gloeobacter</i> <i>Gloeotheca</i> <i>Gleocapsa</i> <i>Prochloron</i>
II	Bâtonnets ou coques unicellulaires ; peuvent être maintenus en agrégats	Scission multiple pour former des hétéocytes	40-46	Seuls quelques hétéocytes sont mobiles	<i>Pleurocapsa</i> <i>Dermocarpus</i> <i>Chroococcidiopsis</i>
III	Filaments, trichomes non ramifiés avec seulement des cellules végétatives	Scission binaire sur un plan unique, fragmentation	34-67	Généralement mobiles	<i>Lyngbya</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Preckiastrix</i> <i>Spirulina</i> <i>Pseudanabaena</i>
IV	Filaments, trichomes non ramifiés, peuvent contenir des cellules spécialisées	Scission binaire sur un plan unique, fragmentation pour former des hormogones	38-47	Souvent mobiles, peuvent produire des akinètes	<i>Anabaena</i> <i>Cylindrospermum</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Nostoc</i> <i>Sextonema</i> <i>Calothrix</i>
V	Trichomes filamenteux, soit ramifiés, soit composés de plus d'une rangée de cellules	Scission binaire sur plus d'un plan, formation d'hormogones	42-44	Peuvent produire des akinètes, complexité morphologique et différenciation les plus grandes chez les cyanobactéries	<i>Fischerella</i> <i>Stigonema</i> <i>Geitleria</i>

1.1.3 Organisation cellulaire

L'absence de membrane nucléaire et d'organites isolés indique que les cyanobactéries sont des procaryotes. En effet, tout comme le noyau, l'appareil photosynthétique n'est pas séparé du protoplasme par une membrane. Certains éléments cellulaires permettent de caractériser les cyanobactéries (Figure 1.2) :

- La paroi cellulaire est de type gram négatif bien que la couche de peptidoglycane y soit plus épaisse que chez la majorité des bactéries gram négatives.
- Le protoplasme périphérique est principalement composé de thylacoïdes et de plusieurs types d'inclusions cytoplasmiques (Figure 1.2) :
 - o Des phycobilisomes : complexes de phycobiliprotéines (qui peuvent être composés de phycocyanines, de phycoérythrocyanines, d'allophycocyanines, ou encore de phycoérythrine). Ils permettent le

- captage du flux lumineux (en lien avec la photosynthèse et les thylacoïdes);
 - Des cyanophycines, lieux de stockage du diazote fixé (sous forme de polymères d'arginine et d'acide aspartique);
 - Des polyglucoses et des gouttelettes lipidiques (réserves énergétiques) (Castenholz, 2001);
 - Des carboxysomes (réserve de rubisCO, enzyme qui permet la fixation du CO₂) (Reviers, 2003).
- On observe également des vésicules de gaz dont la paroi, exclusivement composée de protéines, est hydrophobe et perméable aux gaz (permet aux cyanobactéries d'ajuster leur flottaison) (Reviers, 2003).

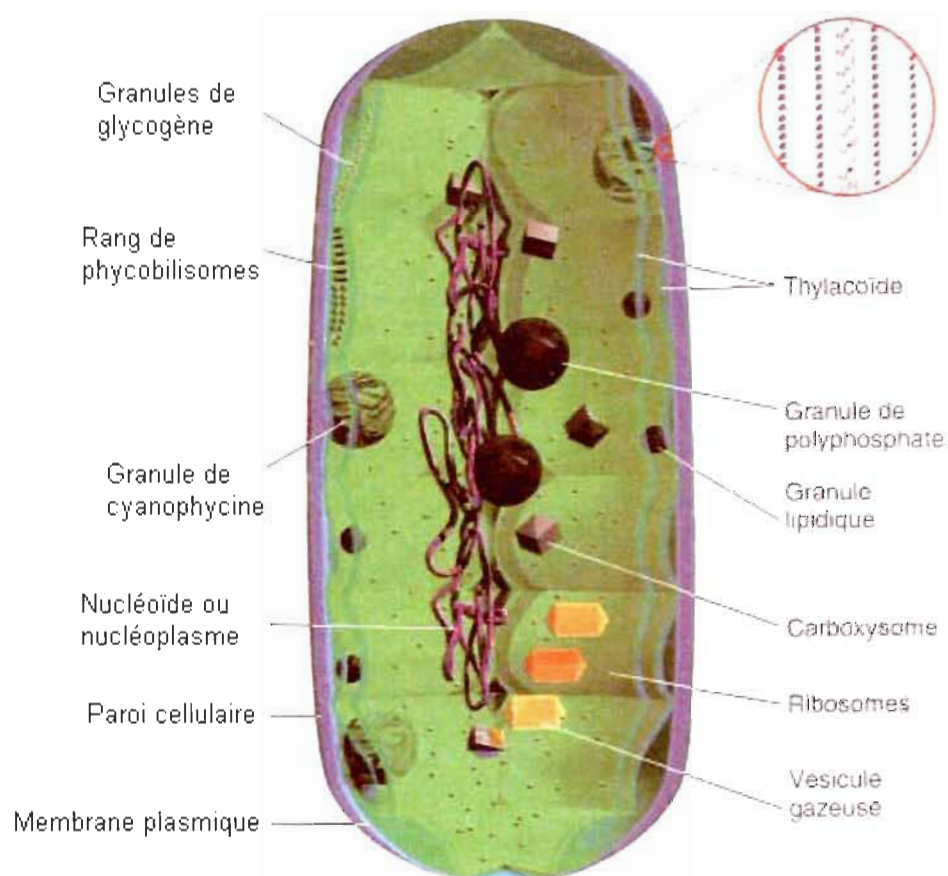


Figure 1.2 : Structure d'une cellule de cyanobactérie (Prescott et al., 2003). L'encart montre un agrandissement de la paroi (membrane externe et du peptidoglycane). Copyright © Hartwell T. Crim, 1998.

1.1.4 Métabolisme

1.1.4.1 Photosynthèse

Les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques. Leur photosynthèse se déroule majoritairement en aérobie. Les électrons sont alors issus de l'oxydation de l'eau, notamment grâce aux photosystèmes PSI et PSII. Mais certaines cyanobactéries peuvent réaliser la photosynthèse en milieu anaérobie (les électrons sont alors issus de l'oxydation du soufre). La capture du flux lumineux nécessaire à la photosynthèse est assurée dans les thylacoïdes par la chlorophylle a (ainsi que la chlorophylle b et d chez certaines cyanobactéries) et par les phycobiliprotéines, regroupées en agrégats au niveau de la membrane externe des thylacoïdes (Figure 1.2) (Lee, 2008).

1.1.4.2 Mode nutritionnel

Le mode nutritionnel des cyanobactéries peut être de trois types (Reviers, 2003; Lee, 2008) :

- Photolithotrophie stricte : Ces cyanobactéries ne peuvent croître qu'en présence de lumière, leur donneur d'électrons est minéral (H_2O ou H_2S) et leur source de carbone est inorganique (CO_2).
- Photohétérotrophie : La croissance se fait également en présence de lumière, la source d'électrons est minérale (H_2O ou H_2S), mais ce groupe de cyanobactéries est capable d'utiliser une source de carbone inorganique ou organique.
- Chimiohétérotrophie facultative : Ces cyanobactéries sont phototrophes en présence de lumière, mais leur croissance peut également se dérouler dans l'obscurité en utilisant une source de carbone organique (limitée au glucose, au fructose et à quelques disaccharides).

1.1.5 Écologie

1.1.5.1 Une bactérie ubiquitaire

On retrouve les cyanobactéries dans la plupart des environnements communs : en eau douce (principalement dans les lacs), sur les littoraux, dans les mers, dans l'air, sur les sols humides et même dans les roches (p. ex. les récifs coralliens) (Reviers, 2003).

Les cyanobactéries sont également capables de s'imposer au sein de milieux aux conditions plus extrêmes (Castenholz, 2001). Des espèces comme *Mastocladus laminosus* ou *Phormidium laminosum* tolèrent des températures de 70°C (Reviers, 2003), d'autres espèces ont été retrouvées sur des surfaces rocheuses de régions désertiques (Yeager et al., 2007), ou encore dans des lacs à salinité élevée ou même hypersalins (Dillon, 2009). C'est leur capacité à résister à la dessiccation qui leur permet de croître dans ces milieux (Castenholz, 2001). Des cyanobactéries sont également présentes dans certains lacs des régions polaires, notamment en Antarctique, où les températures sont très basses (Jungblut, 2005; Taton, 2003). Leur développement s'y explique tout d'abord par une très faible présence d'autres organismes autotrophes (donc peu de compétition). De plus, les cyanobactéries peuvent supporter les alternances congélations/décongélations (Castenholz, 2001).

1.1.5.2 Symbioses

Certaines cyanobactéries, du genre *Nostoc* en général, sont impliquées dans des symbioses avec une large variété d'organismes : des champignons (formation des lichens), des plantes (p. ex. avec famille des bryophytes), des éponges, ou encore des protistes (Adams et Duggan, 2008). Les cyanobactéries fournissent à ces hôtes de l'azote et des carbones fixés (provenant réciproquement du N₂ et du CO₂) (Adams et Duggan, 2008; Lee, 2008).

1.2 Prolifération massives : les floraisons cyanobactériennes

1.2.1 Le phénomène de l'eutrophisation

L'eutrophisation est un phénomène causé par un apport excessif en éléments nutritifs qui conduit à la modification du milieu aquatique touché. La formation des floraisons dépend de la concentration en nutriments inorganiques (nitrates et phosphates), mais aussi de paramètres physiques (température, pH, luminosité). Que ce soit dans les écosystèmes tempérés, tropicaux et même boréals, l'eutrophisation du milieu s'accompagne toujours d'une forte augmentation des populations cyanobactériennes (Havens, 2008). Les lacs eutrophes possèdent une forte concentration en NO_3^- (nitrates) et en PO_4^{3-} (phosphates). Ils s'opposent aux lacs oligotrophes, où la concentration en nutriments inorganiques est faible.

La concentration en nitrates et en phosphates d'un lac dépend de son environnement géologique (richesse du substrat en nitrates ou en phosphates), de la composition minérale des bassins versants, du temps de rétention de l'eau et du degré de mélange des eaux (dont le principal facteur est le vent) (Sigee, 2005). En plus de ces facteurs naturels, l'eutrophisation des lacs est aujourd'hui accélérée par l'activité humaine (rejet des eaux usées domestiques ou industrielles, agriculture intensive, les deux étant riches en azotes et en phosphates) (Paerl, 2008).

1.2.2 Domination du milieu eutrophe par les cyanobactéries

L'eutrophisation a donc comme conséquence l'apparition de fleurs d'eau cyanobactériennes (Sigee, 2005). Les cyanobactéries sont présentes toute l'année dans les réservoirs d'eau douce, mais leur population explose lors des floraisons, généralement au cours de l'été et au début de l'automne (Sigee, 2005). Le captage du dioxyde de carbone (CO_2) à très faible concentration, l'habileté à utiliser des bicarbonates (HCO_3^-) même à pH élevé, la faculté de fixer et d'utiliser le diazote (N_2), combinés à leur capacité à se positionner verticalement dans la colonne d'eau, favorisent le bon développement de cyanobactéries dans les milieux eutrophes (Castenholz, 2001).

De plus, contrairement aux autres membres du phytoplancton, les cyanobactéries possèdent l'avantage de ne pas être digérées par le zooplancton (Siguee, 2005). Enfin, les cyanobactéries sécrètent des sidérophores (hydroxamates) leur permettant de capturer les ions Fe^{3+} environnants et ainsi de limiter la croissance des éventuels compétiteurs (Castenholz, 2001). Les populations cyanobactériennes finissent donc par dominer le phytoplancton du lac eutrophe.

1.2.3 Conséquences sur l'environnement

Les lacs ou les estuaires annuellement concernés par les floraisons cyanobactériennes (ou « bloom formation » en anglais, et dans la figure 1.3) présentent certaines caractéristiques qui ont un impact sur la qualité de l'eau, sur la flore et sur la faune (Havens, 2008). Ces conséquences sont résumées dans la figure 1.3 (Havens, 2008).

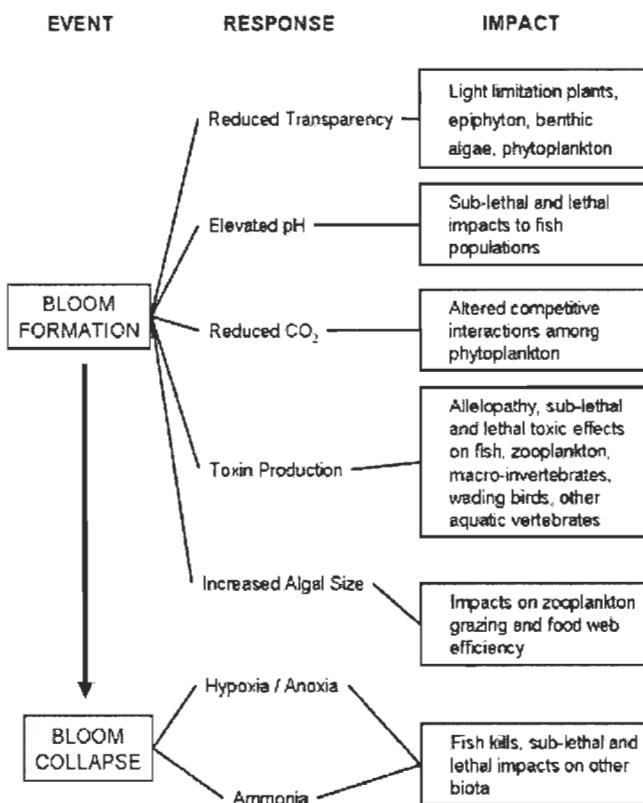


Figure 1.3 : Conséquences associées à la formation de fleurs d'eau cyanobactériennes (Havens, 2008)

La formation des fleurs d'eau cyanobactériennes entraîne donc des conséquences néfastes sur la qualité de l'eau. La flore et la faune se retrouvent complètement modifiées puisque, par exemple, la croissance des végétaux n'est plus permise (à cause de turbidité de l'eau) et que certaines floraisons produisent des toxines aux effets allelopathiques (se dit de composés produits par un végétal qui entraîne des conséquences positives ou négatives sur d'autres végétaux). De plus, les poissons présents dans le lac finissent par mourir en raison du manque d'oxygène dissout dans l'eau (hypoxie puis anoxie) lorsque la densité de la floraison cyanobactérienne devient très forte (que l'on retrouve au niveau du « Bloom collapse » à la figure 1.3). De plus, les floraisons perturbent les activités humaines puisqu'elles entraînent des problèmes d'extraction et de traitement des eaux du lac. Elles ont également des impacts sur l'agriculture et sur la pêche, et elles empêchent les activités récréatives (baignade, canotage, voile, etc.) (Sigee, 2005).

1.2.4 Les floraisons cyanobactériennes dans les lacs du Québec

Au cours de l'année 2008, des floraisons cyanobactériennes ont été observées dans plus de 130 lacs, certains d'entre eux ayant déjà été touchés par une fleur d'eau au cours des années précédentes (points bleus sur la figure 1.4). En 2008, ce problème concernait 13 des 17 régions administratives du Québec (Figure 1.4) (Robert, 2008). La carte ci-dessus (Figure 1.4) donne un aperçu de l'ensemble de lacs Québécois touchés par les floraisons cyanobactériennes en 2008.

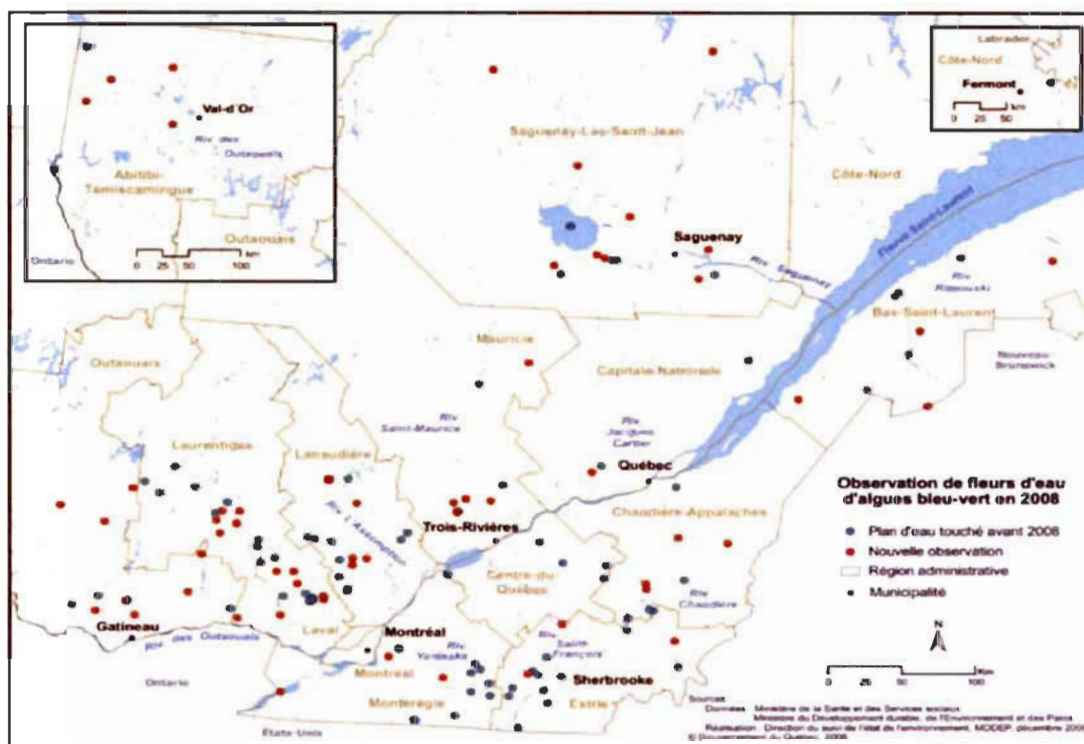


Figure 1.4 : Plans d'eau touchés par une fleur d'eau d'algues bleu-vert en 2008 (Robert, 2008)

En 2008, la présence des floraisons cyanobactériennes a entraîné l'interdiction à tout usage (baignade, pêche, canotage) de sept plans d'eau : les lacs Bleu, Poisson Blanc, Abitibi (Ile Nepawa), Témiscamingue (baie Laperrière), Ouareau, Waterloo et Champlain (baie Missisquoi) (Robert, 2008).

1.3 Les cyanobactéries, des productrices de toxines

1.3.1 Généralités

Les cyanobactéries peuvent produire une grande variété de métabolites secondaires, dont des toxines (cyanotoxines) (Funari et Testai, 2008). Ces cyanotoxines sont des métabolites ubiquitaires, généralement liées à la présence de fleurs d'eau cyanobactériennes (Edwards et Lawton, 2009). Bien que d'importance moindre, la production de cyanotoxines peut cependant avoir lieu en dehors des épisodes de floraisons (Van Apeldoorn et al., 2007). Toutefois, c'est pendant les floraisons

cyanobactériennes que les concentrations de cyanotoxines sont les plus fortes (Sigeo, 2005).

On évalue à 40 le nombre de genres cyanobactériens producteurs de cyanotoxines (Van Apeldoorn et al., 2007). On distingue deux grands groupes de cyanotoxines : les biotoxines, des molécules dont la toxicité envers les vertébrés est forte, et les cytotoxines, un ensemble de molécules ayant un intérêt plutôt pharmacologique de par leurs propriétés spécifiques (Jaiswal et al., 2008).

1.3.2 Types de cyanotoxines et cyanobactéries productrices

1.3.2.1 Les composés cyanobactériens bioactifs ou cytotoxines

Bien que certaines d'entre elles soient tout de même responsables d'irritations cutanées ou de dermatites, les cytotoxines, parfois nommées composés bioactifs (le terme varie selon les auteurs), sont généralement étudiées non pas pour leur toxicité vis-à-vis des vertébrés, mais pour leurs propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-algues et même anti-cancer (Tableau 1.2) (Jaiswal et al., 2008; Humpage, 2008).

Tableau 1.2

Cytotoxines, mode d'action et genre cyanobactérien producteur (Jaiswal, 2008)

Toxin produced	Mode and (or) site of action	Cyanobacterial genera	Reference
Acutiphycin	Antitumor properties, affects tissues	<i>Oscillatoria acutissima</i>	Barchi et al. 1984
Ambigol A and B	Inhibits cyclooxygenase and HIV reverse transcriptase	<i>Fischerella ambigua</i>	Faleh et al. 1993
Aplysiatoxin	Induces Limulus amoebocyte	<i>Lyngbya</i>	Dow and Swoboda 2000
Calothrixin	Inhibits RNA synthesis and DNA replication	<i>Calothrix</i> sp.	Doan et al. 2000
Cryptophycins A-F	Selectively inhibits tumors	<i>Nostoc</i> spp.	Trimurtulu et al. 1994
Cyanobacterin	Inhibits photosystem II activity	<i>Scytonema hofmannii</i> , <i>Nostoc linckia</i>	Gleason and Case 1986
Debromoplysiatoxin	Lysate gelation	<i>Schizothrix calcicola</i> , <i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Dow and Swoboda 2000
Fischerellin	Inhibits photosystem II activity	<i>Fischerella ambigua</i> , <i>Fischerella muscicola</i>	Gross et al. 1991; Papke et al. 1997
Grassypeptolide	Inhibits cancer cell growth	<i>Lyngbya confervoides</i>	Kwan et al. 2008
Hapalindole	Inhibits tumors	<i>Hapalosiphon fontinalis</i> , <i>Fischerella</i> sp.	Moore et al. 1984; Doan et al. 2000; Etchegaray et al. 2004; Asthana et al. 2006b
Hassallidin A	—	<i>Hassallia</i> sp.	Neuhof et al. 2005
Laxaphycin A and B	Inhibits tumor cell proliferation	<i>Anabaena laxa</i>	Frankmole et al. 1992
Linolenic acid	Decreases blood cholesterol levels, reduces the growth of cancers of the breast and colon	<i>Oscillatoria redekei</i> , <i>Fischerella</i> sp.	Mundt et al. 2001; Asthana et al. 2006a
Lyngbyatoxin	Potent tumor promoter, activates calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase C	<i>Lyngbya majuscula</i>	Cardellina et al. 1979; Fujiki et al. 1983; Nishizuka 1984
Norharmaline	Inhibits indoleamine 2,3- dioxygenase and nitric oxide synthase	<i>Nodularia harveyana</i>	Volik 2005
Nostocine	Generates toxic reactive oxygen species	<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Hirata et al. 2003
Nostocyclamide	Inhibits photosynthesis	<i>Nostoc</i> sp. strain 31	Juttner et al. 2001
Oscillatorin	Inhibits photosystem II activity	<i>Oscillatoria luteovirens</i>	Bagchi 1995; Ray and Bagchi 2001
Scytophyecin	Depolarizes cell microfilaments	<i>Scytonema pseudohofmannii</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Cylindrospermum muscicola</i>	Moore et al. 1986; Carmichael et al. 1990; Jung et al. 1991
Spiroidesin	Inhibits cell growth	<i>Anabaena spiroides</i>	Kaya et al. 2002

Le tableau 1.2 ne représente qu'une liste partielle des cytotoxines existantes. Globalement, la plupart des cytotoxines sont des peptides cycliques ou aliphatiques, et ont une forte activité cytostatique et parfois même une capacité à inhiber spécifiquement certaines tumeurs (alors que d'autres, comme la lyngbyatoxine les favorisent) (Jaiswal et al., 2008).

1.3.2.2 Les biotoxines

Contrairement aux molécules étudiées dans la section précédente, les biotoxines sont capables de provoquer des intoxications aiguës, et parfois même létales chez les vertébrés (Van Apeldoorn et al., 2007). Elles sont responsables du danger que représentent les floraisons cyanobactériennes pour l'homme. En fonction de leur

tropisme (ou encore leur affinité des molécules pour certains organes), les biotoxines se divisent en neurotoxines, hépatotoxines et toxines irritantes (Funari et Testai, 2008; Humpage, 2008). La liste des cyanotoxines connues à ce jour et de leurs principaux producteurs est résumée dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3
Les principales cyanotoxines et cyanobactéries productrices

Cyanotoxines	Principaux producteurs	Références
Microcystines	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i> , <i>Microthyobolus</i> , <i>M. botrys</i> , <i>Planktothrix</i> <i>argardii</i> , <i>P. rubescens</i> , <i>P. mougeotii</i> , <i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. circinalis</i> , <i>A.</i> <i>lemnismammii</i> , <i>Nostoc</i> spp., <i>Snowella</i> <i>lacustris</i> , <i>Raphalosiphon hibernicus</i> , <i>Oscillatoria limosa</i> , <i>Cyanobium bacillaria</i> , <i>Arthrospira fusiformis</i> , <i>Limnospira redekii</i> , <i>Phormidium formosum</i>	Botes et al. 1982, Codd and Carmichael 1982, Botes et al. 1985, Kusum et al. 1987, Krishnamurthy et al. 1989, Sivonen et al. 1990, Harada et al. 1991, Watanabe et al. 1991, Sivonen et al. 1992, Ueno et al. 1996, Verzie et al. 1998, Marsalek et al. 2000, Fastner et al. 2001, Prinsep et al. 1992b, Mez et al. 1997, Sivonen et Jones, 1999, Cronberg et al., 2003, Odebrecht et al., 2002, Ballot et al., 2004; Gkelis et al., 2001, Steffenen et al., 2001
Cylindrospermopsins	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>A. flos-</i> <i>aquae</i> , <i>Anabaena bergii</i> , <i>A. lapponica</i> , <i>Unicoclearia nana</i> , <i>Raphidopsis curvata</i> , and as yet other unidentified species	Hawkins et al. 1985, Harada et al. 1994, Banker et al. 1997, Hawkins et al. 1997, Shaw et al. 1999, Li et al. 2001a, Schemm et al. 2001, Ghiani et al., 1992, Fastner et al., 2007, Speef et al., 2006
Saxitoxines	<i>Aphanizomenon</i> spp., <i>Anabaena circinalis</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Lyngbya</i> <i>walleri</i> , <i>Planktothrix</i> spp., and other unidentified species	Jadom and Gentile 1968, Iwawa et al. 1982, Humpage et al. 1994, Carmichael et al. 1997, Lagos et al. 1999, Kaas and Henriksen 2000, Pennati et al. 2000, Li et al. 2000, Li et al. 2003
Nodularines	<i>Nodularia spumigena</i>	Rinheart et al., 1988
Anatoxine-a Homooanatoxine-a	<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. planktonica</i> , <i>Aphanizomenon</i> spp., <i>Planktothrix</i> <i>firmosa</i> , <i>Oscillatoria</i> spp., <i>Microcystis</i> spp., <i>Cylindrospermum</i> spp., <i>Raphidopsis</i> <i>mediterranea</i>	Carmichael et al. 1975, Carmichael and Gordham 1978, Sivonen et al. 1989, Edwards et al. 1992, Ståhlberg et al. 1992, Bruno et al. 1994, Bumke-Vogt et al. 1999, Pask et al., 1993, Namikoshi et al., 2003, Wood et al., 2007, Steffensen et al., 2003
Anatoxine-a(s)	<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. lemniismammii</i>	Matsunaga et al. 1989, Onodera et al. 1993a
β -Methylamino alanine (BMAA)	<i>Anabaena</i> spp., <i>Planktothrix</i> spp., <i>Microcystis</i> spp., <i>Nostoc</i> spp., et la plupart des cyanobactéries symbiotiques terrestres	Cox et al., 2005
LPS endotoxines	Toutes les cyanobactéries	McElhinney et Lawton, 2005

Les microcystines, les nodularines et les cylindrospermopsines sont des hépatotoxines. Les neurotoxines regroupent les anatoxines (l'anatoxine-a, l'homooanatoxine-a, l'anatoxine-a(s)), les saxitoxines et les toxines « BMAA »

(β -Methylamino alanine). Les lipopolysaccharides (LPS) font partie des toxines irritantes (Funari et Testai, 2008; Humpage et al., 2008). Les hépatotoxines et les neurotoxines ciblent respectivement les hépatocytes et le système neuromusculaire (Lee, 2008). Quant aux toxines irritantes, elles sont responsables d'irritations au niveau de la peau ou des yeux, d'allergies ou encore de complications gastro-intestinales. (Funari et Testai, 2008).

D'autres auteurs classent les biotoxines en fonction de leur structure moléculaire. Les microcystines et les nodularines entrent alors dans la catégorie des peptides cycliques, tandis que les anatoxines, les saxitoxines et les cylindrospermopsines sont regroupées dans celle des alcaloïdes (Jaiswal et al., 2008).

Certaines de ces cyanotoxines présentent une forte toxicité pour les animaux et pour les hommes (Carmichael, 2001; Oberholster, 2009). C'est lors de la lyse des cyanobactéries (provoquée lors du traitement de l'eau, ou naturelle lors de la sénescence des cellules ou encore après ingestion au niveau de la barrière acide stomacale) que le risque se manifeste réellement. Les cyanotoxines sont alors abondamment libérées dans le milieu, augmentant dangereusement sa concentration en cyanotoxines (Dyble, 2008). Etant donné que la durée de vie de ces cyanotoxines peut aller jusqu'à 30 jours, le danger peut persister dans le plan d'eau malgré la disparition de la floraison cyanobactérienne (Lathi, 1997).

Le type de cyanotoxines présent dans une fleur d'eau cyanobactérienne dépend donc des populations la composant (Funari, 2008). Toutefois, plusieurs espèces au sein des genres *Microcystis*, *Anabaena* ou *Planktothrix* sont capables de produire plusieurs types de cyanotoxines (Tableau 1.3) (Funari, 2008). Par conséquent, en fonction des espèces composant la floraison cyanobactérienne, cette dernière sera capable de produire une gamme de cyanotoxines plus ou moins vaste. La toxicité de la floraison sera ainsi directement liée aux populations qui la composent.

1.4 Cyanobactéries toxigènes identifiées dans les lacs du Québec

Au Québec, le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ) du ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) est responsable de l'analyse des cyanotoxines contenues dans les lacs périodiquement envahis par les fleurs d'eau cyanobactériennes. Depuis 2001, dans le cadre du « programme de surveillance de la qualité de l'eau potable », le Ministère a mis en place un suivi de l'eau brute (extraite directement du plan d'eau) et de l'eau traitée de stations d'eau potable contenant des cyanobactéries (Robert, 2005). Depuis 2001, deux rapports ont été rédigés : l'un couvrant les années 2001 à 2003 (Robert et al., 2005), et l'autre couvrant les années 2004 à 2006 (Robert et al., 2008).

Le nombre de bassins attenants à des stations de production d'eau potable analysés est progressivement passé de trois à sept entre les années 2001 et 2006. De 2001 à 2002, les analyses des populations cyanobactériennes et le dosage des cyanotoxines ont été faits sur trois stations : celles de Bedford, sur la baie Missisquoi, de Plessisville et de Daveluyville, au niveau de la rivière Bécancour. Il a ensuite été ajouté à ces analyses celles des bassins approvisionnant les stations d'eau potable de Saint-Hyacinthe (2002), de Farnham (2003), de Saint-Damase (2003) sur la rivière Yamaska et enfin celles de Sorel-Tracy (2005), sur la rivière Richelieu. Ces sept stations avaient été choisies car elles étaient concernées par des floraisons cyanobactériennes depuis plusieurs années (Robert et al., 2005; Robert et al., 2008).

Afin de rendre compte de la situation concernant les cyanobactéries toxigènes au Québec, nous avons extrait des rapports présentés par Caroline Robert en 2005 et en 2008 les proportions d'échantillons contenant au moins une espèce productrice de cyanotoxines, et ce, au cours des six années de suivi (Tableau 1.4).

Tableau 1.4
Présence d'espèces cyanobactériennes connues pour produire des cyanotoxines
dans sept stations de production d'eau potable sélectionnées au Québec.
Analyses faites par microscopie (Robert et al., 2008)

Année de suivi	Nombre (et proportion) d'échantillons contenant au moins espèce cyanotoxique
2001	25 (92,6%)
2002	23 (100%)
2003	32 (62,7%)
2004	43 (78,2%)
2005	40 (87,0%)
2006	20 (87,0%)

Par ailleurs, les observations microscopiques de ces échantillons ont permis l'identification de plusieurs espèces potentiellement productrices de microcystines. Les espèces *Anabaena* (*flos-aquae*, *spiroïdes*, *planctonica*, *solitaria*), *Microcystis* (*flos-aquae*, *aeruginosa*, *viridis*, *wasenbergii*) et *Oscillatoria agardhii* (renommée *Plankthotrix agardhii* depuis les travaux de Komarek en 1988 (Suda, 2002)) ont été identifiées lors de l'analyse des échantillons (Robert, 2005; Robert 2008).

En moyenne, au cours de ces six années de collectes de données, il aura été observé au moins une espèce toxigène dans 81 % des échantillons. De plus, la dominance sur la population cyanobactérienne par une espèce toxigène aura varié entre 30,9 % et 82,6 % dans ces échantillons (Robert, 2008).

Des populations cyanobactériennes productrices de microcystines sont donc présentes dans les lacs du Québec. Dans le prochain chapitre, nous étudierons plus en détail les microcystines, nous rechercherons les causes responsables de leurs productions et nous détaillerons leur toxicité et donc le danger qu'elles représentent pour l'homme. Nous finirons par les méthodes mises en place au Québec pour les détecter.

CHAPITRE 2

LES MICROCYSTINES

2.1 Introduction aux microcystines

2.1.1 Généralités

Les microcystines sont les cyanotoxines les plus communes et les plus représentées dans les lacs du monde entier (Hotto et al., 2007; Dittmann et al., 2005). Elles sont principalement synthétisées par les cyanobactéries appartenant aux genres *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* et *Nostoc* (Hotto et al., 2007). Les microcystines forment un groupe de molécules, toutes cycliques et composées de sept acides aminés (heptapeptide) (Van Apeldoorn et al., 2007) (Figure 2.1). Leur masse varie entre 500 et 4000 Da (Van Apeldoorn et al., 2007). La structure générale des microcystines est cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷) (Figure 2.1) (Sivonen, 1999).

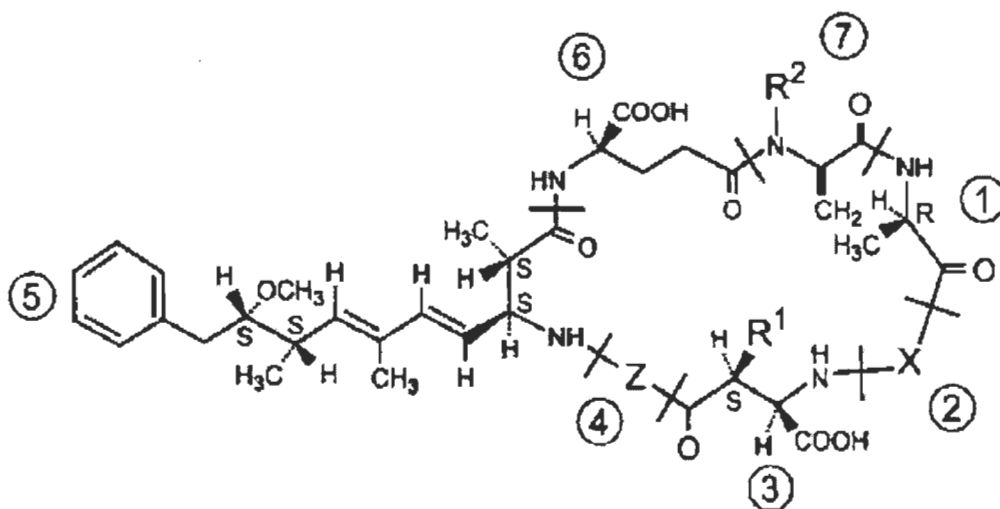


Figure 2.1 : Structure générale des microcystines (Chorus et Bartram, 1999)

L'acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldeca-4,6-dienoic, également nommé Adda (position 5 de la figure 2.1), est commun à toutes les

hépatotoxines (Van Apeldoorn et al., 2007). Son rôle dans la toxicité des microcystines est primordial. Sa fonction sera détaillée dans la partie 2.3.3 (Toxicodynamique des microcystines sur les hépatocytes).

2.1.2 Isoformes

Des variations structurales plus ou moins importantes ont été rapportées pour les sept acides aminés de la structure générale de la microcystine présentée en figure 2.1. Il a été répertorié à ce jour plus de 80 variants de microcystines (Hotto et al., 2007; Chen et al., 2009). Cependant, les différentes isoformes des microcystines sont principalement dues à des substitutions d'acides aminés aux positions 2 (X) et 4 (Z) ou bien à la présence ou à l'absence de groupements méthyles ($-\text{CH}_3$) aux positions 3 (MeAsp) et 7 (Mdha) de la microcystine (Sivonen, 1999). Les isoformes de microcystines les plus communes sont les microcystines-LR, -RR, et -YR, où les acides aminés variables (X^2 et Z^4) sont la leucine (L), l'arginine (R) et la tyrosine (Y) (Izaguirre, 2007).

2.2 Origine des microcystines dans les eaux de lacs

2.2.1 Régulation de la production de microcystines

2.2.1.1 Paramètres environnementaux

La production de microcystines semble influencée par différents paramètres environnementaux : l'azote, le phosphore, la température, l'intensité lumineuse, le pH et les traces de métaux (Neilan et al., 2008; Kotac et al., 2000; Sivonen et al., 1999, Sivonen, 1990). Quelques tendances générales se dégagent des études traitant de cette régulation des microcystines. La production de microcystines est notamment favorisée lorsque le milieu contient une forte concentration en azote (Sivonen, 1990; Watanabe et Oishi, 1985) et lorsqu'il est pauvre en Fe^{3+} (Lukac et al., 1993). En ce qui a trait aux résultats concernant les autres variables étudiées, c'est-à-dire la concentration en phosphates (Catherine et al., 2008; Oh et al., 2000; Watanabe et Oishi, 1985), l'intensité

lumineuse (Sivonen et al., 1990; Watanabe et Oishi, 1985) la température ou encore le pH (Jaiswal et al., 2008 et al.; Pearson et al., 2008), ils ne sont pas toujours concordants.

Cependant, il paraît évident que ces paramètres modulent la production de microcystines, mais leur implication dans la régulation de cette synthèse est encore mal comprise (Pearson, 2008). Trop de paramètres sont souvent variables, par exemple on remarque que les genres cyanobactériens cultivés ou les types de microcystines analysés diffèrent bien souvent d'une étude à l'autre. Comme l'écrivent Neilan et al. (2008), la plupart des études traitant de la régulation n'ont pas été standardisées, rendant le sujet de la régulation des microcystines quelque peu controversé.

D'un autre côté, certains auteurs ont remarqué que la production de microcystines était optimum lorsque les conditions de croissance de l'espèce cyanobactérienne étudiée l'étaient également (Sivonen et Jones, 1999; Jaiswal et al., 2008). Dans ce cas, la phase de croissance dans lequel la population cyanobactérienne se trouve jouerait donc un rôle primordial dans la production des microcystines.

2.2.1.2 Phase de croissance cellulaire

La production de microcystines semble ainsi être influencée par la phase de croissance dans laquelle se situe la culture (ou fleur d'eau cyanobactérienne) (Jaiswal, 2008; Sivonen, 1999). En effet, Sivonen et al. (1999) et Yan et al. (2004) ont remarqué que la concentration intracellulaire en microcystines était à son maximum au moment de la phase tardive (ou de ralentissement) de croissance. De plus, Long et al. (2001) constatent que le taux de production de microcystines est proportionnel au taux de croissance de la culture cyanobactérienne, que les conditions environnementales restreignent ou favorisent la croissance cellulaire. Si c'est bien la croissance cellulaire qui régule la production de microcystines, les paramètres environnementaux cités ci-dessus n'auraient alors qu'un effet indirect sur la production de microcystines, agissant en fait principalement sur la croissance de la population cyanobactérienne, et donc sur le nombre de cyanobactéries présentes dans le milieu (Pearson, 2008; Downing, 2005).

2.2.2 Relâche de microcystines dans le milieu

Lorsque la culture cyanobactérienne est en phase tardive (ou phase de ralentissement) de croissance cellulaire, il y a une relâche de microcystines dans le milieu. En effet, c'est à ce moment que la concentration en microcystines dans le milieu augmente fortement (Jaiswal, 2008; Lee, 2000). La relâche massive de microcystines dans le milieu serait, selon certains auteurs, principalement due à l'âge de la culture cyanobactérienne (Rapala, 1997; Jaiswal, 2008). Les microcystines sont alors libérées lorsque la paroi cellulaire devient plus perméable ou encore qu'arrive la lyse cellulaire (phase de stationnement de croissance) (Dyble, 2008). Une autre explication quant à la présence de microcystines dans le milieu serait l'existence d'un transporteur transmembranaire de microcystines qui permettrait son acheminement vers le milieu extracellulaire (Kaebernick, 2000). Tillett et al. (2000) ont appuyé cette hypothèse en faisant l'analogie entre un des gènes (*mcyH*) de l'opéron codant pour les microcystines synthétases et les gènes de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette).

2.3 Toxicité des microcystines

2.3.1 Voies de contamination par les microcystines

2.3.1.1 Contamination directe

Libérées ou non dans le milieu, les microcystines représentent un danger pour l'homme. Les activités récréatives (du type baignade, canotage) peuvent être une source de contamination aux microcystines. Lors de ces activités, la contamination peut se faire par inhalation, par simple contact épidermique, ou encore par ingestion directe de microcystines (libres ou dans la cellule cyanobactérienne) (Funari et Testai, 2008). La contamination par l'eau « potable » (eau contenant alors encore une forte concentration en microcystines) est envisageable par simple consommation d'eau du robinet ou même par intraveineuse (p. ex. lors de traitement par dialyse) (Carmichael et al., 2001). La présence de microcystines dans l'eau potable s'explique généralement par un traitement inadéquat de l'eau du bassin approvisionnant la station d'épuration (p. ex. chloration de

l'eau : traitement bactéricide qui aura pour effet de libérer les microcystines) (Robert, 2004). Cependant, des traitements au charbon activé ou par ozonation révèlent une bonne efficacité pour éliminer les microcystines, bien que cette élimination ne soit jamais totale (Robert et al., 2008).

2.3.1.2 Contamination indirecte

Les microcystines peuvent être également ingérées à la suite d'une consommation d'animaux ou de plantes ayant accumulé des microcystines dans leurs tissus (Magalhães et al., 2001). Les premiers organismes en cause sont les mollusques, puisqu'ils sont de grands consommateurs de phytoplancton. Gérard et al. (2008) démontrèrent qu'une partie des microcystines ingérées était en effet stockée dans certains tissus des mollusques. De plus, d'autres études informent que des concentrations importantes de microcystines ont été retrouvées dans les tissus de poissons (jusqu'à 478 mg.kg⁻¹), de canards et d'autres oiseaux (entre 18 et 30 µg.kg⁻¹) (Magalhães et al., 2001; Chen et al., 2009). En outre, ces cyanotoxines peuvent s'accumuler dans les tissus de plantes comestibles par l'intermédiaire de l'eau d'irrigation (McElhiney et al., 2001). Mohamed et Shehri (2009) ont conclu que des cultures (dont celles de radis, de laitue, de persil et de chou) irriguées par de l'eau provenant de lacs contaminés contenaient une dose dangereuse de microcystines (0,07 à 1,2 mg.kg⁻¹). Etant donné que l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a fixé à 0,04 µg.kg⁻¹ la limite journalière de microcystines consommées, l'ingestion de ces aliments représenterait un risque potentiel pour l'homme (Burch, 2008).

2.3.2 Structure moléculaire des microcystines : une affinité pour les protéines phosphatases hépatocytaires

Les microcystines font partie de la famille des hépatotoxines puisque cette toxine possède un tropisme pour les hépatocytes (Dittmann et Wiegand, 2006). La toxicité des microcystines est fonction de leur composition moléculaire. La plus toxique des microcystines est également la plus commune : la microcystine-LR (leucine-arginine). La toxicité des microcystines est mesurée selon le résultat de la LD₅₀ (dose létale 50 %)

après injection intrapéritonéale de microcystines à des souris (Funari et Testai, 2008; Humpage, 2008). La LD₅₀ des microcystines est comprise entre celle de la MC-LR (60µg/kg) et celles de plusieurs autres isoformes de microcystines (> 1200µg/kg) (Zurawell et al., 2005).

Au niveau moléculaire, bien que la toxicité des microcystines diffère en fonction de leur composition moléculaire, elle est principalement attribuée à un acide aminé rare, abrégé « Adda » (groupe 5 de la figure 2.1). La structure de Adda lui permet d'inhiber de façon spécifique les protéines serines/thréonines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A) en se liant à leur site catalytique (MacKintosh et al., 1990; Nishiwaki-Matsushima et al., 1991). D'ailleurs, des changements moléculaires dans la structure de la fraction Adda affectent directement la toxicité des microcystines (Bourne et al., 1996), les rendant généralement moins toxiques ou même non toxiques (Van Apeldoorn et al., 2007). Certains chercheurs avancent également l'importance de l'acide aminé D-Glu (groupe 6 de la figure 2.1) dans l'affinité des microcystines pour les PP1 et PP2A (Rantala et al., 2006).

2.3.3 Toxicodynamique des microcystines sur les hépatocytes

2.3.3.1 Exposition aiguë aux microcystines (fortes doses)

Une fois ingérées, les microcystines sont transportées de l'intestin vers le foie par le système de transport de l'acide biliaire (Miura et al., 1989). L'inhibition des protéines phosphatases engendre une hyperphosphorylation de nombreuses protéines cellulaires, dont les protéines du cytosquelette cellulaire (Wickstrom et al., 1995). Cette désorganisation du cytosquelette entraîne des pertes d'adhérence entre les cellules, qui sont la cause d'hémorragies intra-hépatiques (Humpage, 2008). Un autre effet cytotoxique qu'entraîne la présence de microcystines dans les hépatocytes est la perméabilisation de la membrane des mitochondries. Il y aura alors libération des espèces réactives oxygénées ou ROS (Reactive Oxygen Species). Ce stress oxydatif, accentué par la perte du contrôle de la phosphorylation par la cellule, active la voie intrinsèque de l'apoptose (Rao et Bhattacharya, 1996; Zegura et al., 2003 et 2008).

Parmi les nombreux exemples d'intoxication humaine par des microcystines, celui de Caruaru (Brésil), en 1996, est le plus marquant (Carmichael et al., 2001). Au cours de l'année 1996, 52 patients sur les 131 du centre de dialyse de Caruaru sont morts suite à la présence de microcystines (-YR, -LR et -AR) dans l'eau utilisée pour leurs dialyses. La concentration des microcystines dans l'eau était de 19,5 µg/L. La concentration en microcystines considérée par l'OMS comme limite est 1 µg/L (Burch, 2008) : une concentration supérieure à cette dernière est reconnue comme dangereuse pour l'homme (selon l'OMS). La concentration en microcystines dans l'eau à Caruaru était donc 19,5 fois supérieure à la concentration déjà considérée comme dangereuse. Seulement cette limite acceptable en microcystines dans l'eau potable tient compte du fait qu'en cas d'ingestion d'eau contaminée, seulement une partie des microcystines absorbées seront assimilées et pourront se retrouver dans le sang. On peut supposer que seulement 1/100 ou 1/1000 des microcystines absorbées seront assimilées, le reste étant possiblement dégradé lors du passage de la barrière acide de l'estomac. Or dans le cas présent, l'eau contaminée par les microcystines se retrouve directement dans le sang puisqu'elle passe par le système de dialyse, ce qui explique le fort taux de mortalité observé à Caruaru (40 %).

2.3.3.2 Exposition chronique aux microcystines (faibles doses)

D'autres études rapportent que des expositions répétées à de faibles doses de microcystines seraient à l'origine de cancers du foie (Ueno et al., 1996; Nishiwaki-Matsushima, 1991 et 1992). Contrairement à l'effet apoptotique vu à la section précédente, une faible dose de microcystines aurait un effet tumoral (Zegura et al., 2008). Certains auteurs ont proposé comme hypothèse que l'effet tumorigénique des microcystines serait causé par une somme de facteurs d'activation du cycle cellulaire. Entre autres, une faible dose de microcystines engendrerait alors une faible réponse de ROS, insuffisante pour activer la voie apoptotique, mais satisfaisante pour promouvoir la multiplication cellulaire (Herfindal et Selheim, 2006).

2.4 Les microcystines dans les lacs du Québec

2.4.1 Méthode de détection des microcystines

Au Québec, le CEAEQ du MDDEP dose trois isoformes des microcystines (MCYST-LR, MCYST-YR et MCYST-RR) à partir d'eau prélevée dans des lacs (ou bassin) annuellement concernés par des floraisons cyanobactériennes. Ces analyses ont été faites aux mêmes stations décrites dans la partie 1.4 du chapitre 1.

Le dosage des isoformes MC-LR, MC-RR et MC-YR de la microcystine est réalisé par chromatographie en phase liquide (HPLC), couplé à un spectrophotomètre de masse (Robert et al., 2005). La détection et l'identification des microcystines sont basées sur leurs propriétés physicochimiques. En effet, la HPLC se base sur le poids moléculaire, sur les chromophores, et sur la réactivité des groupes fonctionnels composant la molécule ciblée (microcystines). De plus, l'association de la HPLC avec la spectrophotométrie de masse rend la méthode ultra sensible et lui permet de détecter d'infimes variations dans la structure moléculaire des microcystines (Kondo et al., 1992), d'où la détection des isoformes de microcystines.

2.4.2 Détection des microcystines dans les lacs du Québec, entre les années 2001 et 2006

Le tableau 2.1 présente les résultats de la détection des microcystines ciblées (-LR, -RR et -YR), à partir d'eau non traitée issue de sept stations d'épuration (Chapitre 1, section 1.4) entre les années 2001 et 2006 (issus des rapports rédigés par Caroline Robert en 2005 et en 2008).

Tableau 2.1

Fréquence de détection des microcystines dans les échantillons d'eau non traitée, prélevés entre 2001 et 2006 (Robert et al., 2008)

Année de suivi	Nombre (et proportion) d'échantillons présentant une concentration détectable de microcystines		
	MC-LR	MC-RR	MC-YR
2001	9 (34,6%)	0 (0%)	0 (0%)
2002	14 (60,9%)	3 (13,0%)	5 (21,7%)
2003	5 (9,8%)	0 (0%)	1 (2,0%)
2004	27 (49,1%)	20 (36,4%)	15 (27,3%)
2005	34 (73,1%)	21 (45,7%)	12 (26,1%)
2006	19 (79,2%)	20 (83,3%)	12 (50,0%)

Les analyses entre les années 2001 et 2006 confirment tout d'abord la présence de microcystines dans les bassins d'approvisionnement des stations d'eau potable étudiées. Ensuite, on peut remarquer que les résultats entre les deux différentes études (2001-2003 et 2004-2006) dénotent de grandes disparités (Tableau 2.1). Tout en sachant que le nombre d'échantillons a été identique d'une étude à l'autre (100 échantillons), on constate que 28 % des échantillons contiennent de la MCYST-LR entre 2001 et 2003, contre 80 % entre 2004 et 2006 (ces variations sont globalement les mêmes si on compare de manière similaire les pourcentages des MCYST-RR et des MCYST-YR) (Robert et al., 2008). Cette disparité, d'après Robert et al. (2008), n'est cependant pas due aux méthodes d'analyses, puisqu'elles n'ont pas significativement changé entre 2001 et 2006. Elle serait alors causée par les variations interannuelles dans la composition cyanobactérienne des fleurs d'eau (Robert et al., 2008), notamment par les changements de dominance de certaines populations cyanobactériennes d'une année à

l'autre, productrices de microcystines ou non, ou encore par les échanges de populations cyanobactériennes des lacs, grâce aux communications qu'il existe entre certains d'entre eux (canaux ou rivières les reliant les uns aux autres).

D'où finalement la nécessité de mieux connaître les communautés cyanobactériennes productrices de microcystines des lacs au Québec, afin d'être en mesure d'anticiper la possible production de microcystines lors des floraisons cyanobactériennes annuelles.

2.4.3 Vers un meilleur criblage des populations productrices de microcystines

L'étude réalisée entre les années 2001 et 2006 par le CEAEQ (au Québec) permet de mettre en évidence la faiblesse du rapport entre la présence d'une espèce cyanobactérienne connue pour produire des microcystines et la présence de microcystines dans l'eau du lac analysé. En effet, le tableau 2.2 (qui est une combinaison des tableaux 1.4 et 2.1), témoigne du fait que la présence d'espèces cyanobactériennes dites « toxigènes » ne signifie pas que des microcystines seront nécessairement synthétisées.

Tableau 2.2
Comparaison entre la détection des microcystines et la détection d'espèces cyanobactériennes toxigènes (Robert et al., 2008)

Année de suivi	Nombre (et proportion) d'échantillons présentant une concentration détectable de microcystines			Nombre (et proportion) d'échantillons contenant au moins espèce cyanotoxique
	MC-LR	MC-RR	MC-YR	
2001	9 (34,6%)	0 (0%)	0 (0%)	25 (92,6%)
2002	14 (60,9%)	3 (13,0%)	5 (21,7%)	23 (100%)
2003	5 (9,8%)	0 (0%)	1 (2,0%)	32 (62,7%)
2004	27 (49,1%)	20 (36,4%)	15 (27,3%)	43 (78,2%)
2005	34 (73,1%)	21 (45,7%)	12 (26,1%)	40 (87,0%)
2006	19 (79,2%)	20 (83,3%)	12 (50,0%)	20 (87,0%)

On constate donc que la proportion d'échantillons contenant une espèce cyanobactérienne est toujours supérieure à la proportion d'échantillons contenant des microcystines. Evidemment, ces écarts s'expliquent tout d'abord par le fait que la production de microcystines n'est pas constitutive (comme détaillé dans la section 2.2.1), on sait que la production des microcystines est contrôlée par certains facteurs environnementaux.

Cependant, même si les facteurs environnementaux peuvent expliquer la différence entre le dosage des microcystines et l'observation de cyanobactéries productrices de microcystines, il est important de ne pas conclure trop vite à l'observation de cyanobactéries productrices de microcystines. En effet, l'observation d'une espèce référencée comme productrice de microcystines ne signifie pas que toutes les populations regroupées dans cette espèce sont capables de produire des microcystines. Par exemple, l'espèce *Microcystis aeruginosa* fait partie des producteurs les plus communs de microcystines (Hotto, 2007) et pourtant, même au sein même de cette espèce, il existe des souches productrices de microcystines et d'autres incapables d'en produire (Foulds et al., 2002). Par conséquent, une floraison cyanobactérienne causée par l'espèce *Microcystis aeruginosa* peut ne jamais produire de microcystines. Les écarts entre le dosage des microcystines et l'observation de cyanobactéries productrices de microcystines du tableau 2.2 peuvent donc très bien être dus à des erreurs dans l'identification de populations productrices de microcystines.

La capacité à produire des microcystines par les cyanobactéries est uniquement due à la présence d'une série de gènes regroupés en opéron et codant pour une série de microcystines synthétases (gènes *mcy*) (Tillett, 2000). Etant donné que les cyanobactéries ne sont pas classées en fonction de leur capacité à produire des toxines, il existe au sein d'espèces référencées « productrices de microcystines » des populations ne possédant pas l'opéron de la microcystine synthétase. Ces populations sont donc incapables de produire des microcystines. D'où la nécessité d'analyser les populations cyanobactériennes au niveau de leur génome : une population qui possède les gènes *mcy* pourra produire des microcystines.

CHAPITRE 3

OPÉRON DE LA MICROCYSTINE SYNTHÉTASE (MCY)

3.1 Biosynthèse des microcystines : une catalyse non ribosomale

3.1.1 Preuve de cette synthèse non ribosomale

À la suite des observations faites sur les microcystines (petite taille, structure cyclique et richesse en acides aminés modifiés), Krishnamurthy et al., (1989) puis Dittmann et Börner (2005) ont suggéré qu'elles étaient synthétisées par des peptides synthétases (Dittmann et Börner, 2005). Des gènes codant pour des peptides synthétases chez des cyanobactéries des genres *Microcystis* et *Anabaena* ont par ailleurs été identifiés (Meißner et al. 1996; Neilan et al., 1999). De plus, Dittman et al. (1997) ont vérifié l'hypothèse d'une synthèse des microcystines par des peptides synthétases par mutagenèse dirigée : une séquence d'ADN (2982 pb), codante partiellement pour un peptide synthétase et spécifique des cyanobactéries productrices de microcystines a été remplacée par une cassette de résistance au chloramphénicol. Les mutants sélectionnés se sont alors révélés incapables de produire des microcystines. Ces expériences ont permis de démontrer que la différence qu'il existe entre les souches cyanobactériennes productrices de microcystines et les souches non toxiques était la présence de gènes codant pour des peptides synthétases spécifiques, catalysant les microcystines (Dittman et al., 1997).

3.1.2 Fonctionnement général des PKS et des NRPS

La synthèse des microcystines est donc réalisée de façon non ribosomale, c'est-à-dire que la synthèse du peptide est indépendante des ribosomes. Cette synthèse, généralement réservée à des peptides inférieurs à 50 acides aminés, est basée sur un mécanisme nommé « thiotemplate » et permet la synthèse de peptides par l'activité catalytique de synthétases. Ce type de synthèse non ribosomale est bien connue chez les

procaryotes mais plus rarement chez les eucaryotes (Dittmann et Börner, 2005). Ce mécanisme a notamment été décrit par Schwarzer et al. (2003) chez les bactéries du genre *Bacillus* et chez les champignons filamenteux, où il est responsable entre autres de la synthèse d'antibiotiques (p. ex. la gramicidine S ou la vancomycine A), d'immunosuppresseurs (p. ex. la cyclosporine) et de plusieurs molécules toxiques pour les plantes et les animaux. En ce qui concerne la catalyse des microcystines, deux types de synthétases sont nécessaires : des peptides synthétases, abrégé NRPS (Non Ribosomale Peptide Synthetase, figurés par des rectangles sur la figure 3.1), et des polykétides synthétases, abrégé PKS (figurés par des cercles sur la figure 3.1) (Tillett et al., 2000; Neilan et al., 2008).

Les NRPS possèdent une organisation modulaire (Tillett et al., 2000; Neilan et al., 2008). Ils peuvent être composés d'un ou de plusieurs modules, chaque module étant responsable d'une étape enzymatique dans la biosynthèse des microcystines. Le premier module sert généralement à l'initiation (encore nommée « activation ») et permet de débiter la synthèse. Quant aux modules suivants, ils sont responsables de l'élongation du peptide (Kleinkauf et Von Döhren, 1996; Dittmann et Börner, 2005). Les modules d'élongation sont caractérisés par trois domaines (Kleinkauf et Von Döhren, 1996) :

- Adénylation (A) : permet la fixation de l'acide aminé et son activation par une réaction d'adénylation (l'acide aminé fixé est transformé en aminoacyl adénylé).
- Thiolation (T) : permet au peptide en formation de rester accroché à la synthétase par une liaison thioester.
- Condensation (C) : permet la catalyse des différentes réactions (spécifiques à chaque module) et la formation de la liaison peptidique.

Comme déjà indiqué, la synthèse des microcystines nécessite donc également l'action de polykétides synthétases (PKS). Les polykétides (ou polycétides), tout comme les protéines non ribosomales décrites ci-dessus, sont présents chez de nombreuses bactéries et regroupent une grande variété de métabolites secondaires aux rôles divers : messagers dans la communication de cellule à cellule, antibiotiques ou

immunosuppresseurs (Callahan et al., 2009). Les polykétides proviennent de la polymérisation de monomères de thioester par les PKS (Callahan et al., 2009). Tout comme les NRPS, les complexes enzymatiques de PKS ont une structure modulaire (Figure 3.1), et chacun des modules est responsable d'une réaction enzymatique spécifique, dont l'action, dans le cas de la microcystine, permet la formation de la fraction Adda (Dittmann et Börner, 2005).

Peu de systèmes combinant les PKS et les NRPS sont aujourd'hui connus, et le système PKS/NRPS codé par les gènes *mcy* et catalysant la formation des microcystines est un des rares à être identifié avec ceux catalysant la rapamycine, la bléomycine, la versiniabactine et de la mycobactine (Tillett et al., 2000).

La finalisation de la synthèse du peptide par les synthétases a lieu grâce à un domaine terminal (domaine Te : réaction de thioesterification) responsable de la libération du peptide par lyse de la liaison thioester entre le peptide et le domaine T du dernier module d'élongation (Kleinkauf et Von Döhren, 1996).

3.1.3 Catalyse des microcystines : cas de la MCYST-LR chez *Microcystis aeruginosa* PCC7806

Afin d'illustrer la synthèse des microcystines par le système PKS/NRPS, nous avons choisi de détailler celle de l'isoforme de microcystines la plus commune : la MCYST-LR (microcystine dont les positions 2 et 4 sont respectivement occupées par une leucine et une arginine, voir figure 2.1). Cependant, les premières étapes sont identiques à toutes les microcystines. En effet, la synthèse des microcystines débute toujours par la formation de la fraction Adda (à la position 5 de la figure 2.1). Cette synthèse est principalement réalisée grâce à l'activité enzymatique des domaines spécifiques de PKS (Figure 3.1a). Les trois synthétases nécessaires à sa formation sont McyG, McyD et McyE. La suite de la biosynthèse des microcystines est réalisée à partir de la fraction Adda et utilise, au fur et à mesure, les NRPS McyA, McyB et McyC (Figure 3.1b). Finalement, grâce à l'activité catalytique des PKS puis des NPRS, sont

associés dans l'ordre les acides aminés L-Z-Adda, L-Glutamate, L-méthylserine, D-alanine, L-leucine, D-méthyl-aspartate et L-arginine.

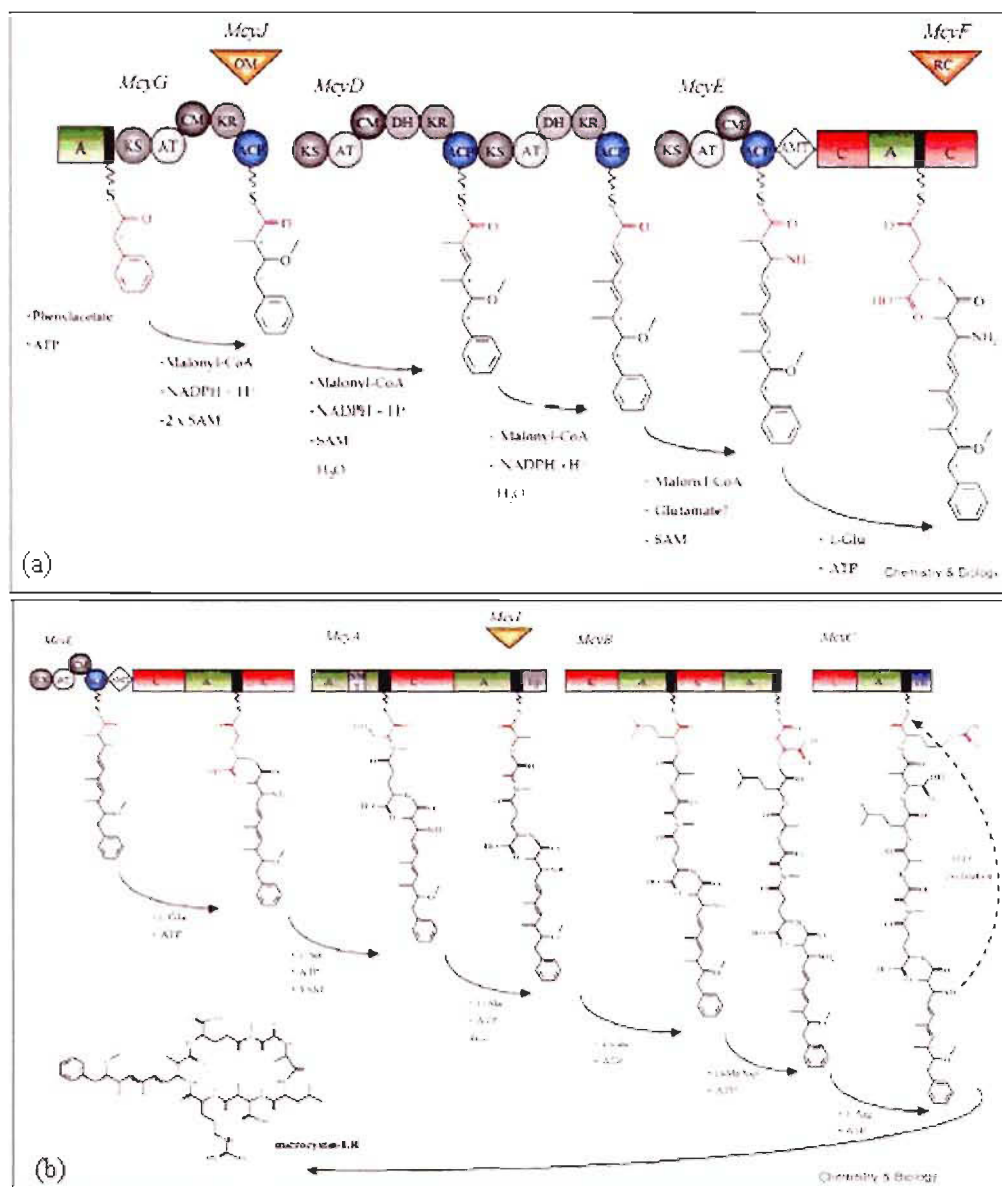


Figure 3.1 : (a) Biosynthèse de la fraction Adda des microcystines. (b) Suite et fin de la biosynthèse de la microcystine-LR. Les cercles représentent les domaines PKS et les rectangles les domaines NRPS. Domaines abrégés : AT (acyltransferase), KS (β -ketoacyl synthase), ACP (acyl carrier protein), KR (ketoacyl reductase), DH (déhydratase), CM (C-méthyltransferase), OM (O-méthyltransferase), NM (N-méthyltransferase), AMT (amino-transferase), RC (racemase), A (aminoacyl adénylation), C (condensation), Ep (épimérisation), TE (thioestérase) (Tillett et al., 2000).

Finalement, l'identité des microcystines dépend des deux derniers complexes enzymatiques (McyB et McyC) impliqués dans la catalyse des microcystines. En effet, dans le cas de la MCYST-LR, McyB est responsable de la liaison de la L-leucine et McyC de la L-arginine à la structure des microcystines. La synthèse se termine par la cyclisation des microcystines (Tillett et al., 2000; Dittmann et Börner, 2005).

3.2 Base génétique de la production de microcystines

3.2.1 Organisation des gènes *mcy* dans le génome des genres *Microcystis*, *Plankthotrix* et *Anabaena*

Neilan et al. (1999) ont démontré que des orthologues de gènes codant pour des microcystines synthétases étaient présents dans de nombreuses souches toxiques du genre *Microcystis*, mais également dans des souches toxiques des genres *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Plankthotrix*) et *Nostoc*. Le premier opéron *mcy* entièrement séquencé est celui de *Microcystis aeruginosa* PCC7806 en 2000 (Tillett et al., 2000). Viennent ensuite les séquençages des gènes *mcy* chez *Plankthotrix agardhii* CYA 126 en 2003 et chez *Anabaena* strain 90 en 2004 (Christiansen et al., 2003; Rouhiainen et al., 2004). Les synthétases (polykétides/polycétide ou peptides) proviennent de la transcription/traduction des gènes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* et *mcyG*. Les gènes *mcyF*, *mcyI*, *mcyJ* et *mcyT* codent pour des « tailoring enzymes » opérant lors de la catalyse des microcystines par les synthétases. Le gène *mcyH* code possiblement pour un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) (Tillett et al., 2000; Pearson et al., 2004). Pour finir, certaines séquences proches de la région 3' des gènes *mcy* possèdent de fortes similarités avec des gènes codant pour des transposases (Tillett et al., 2000; Moffitt et Neilan, 2004).

L'ensemble des gènes *mcy* fait environ 55 kpb et se compose donc de 10 gènes (Neilan et al., 2008), codant tous pour des enzymes impliquées dans la catalyse des microcystines (sauf *mcyH*). On notera que dans le génome de *Microcystis* et d'*Anabaena*, les gènes *mcy* sont divisés en deux unités de transcription dont les sens de transcription sont opposés (Figure 3.2), alors que dans le génome de *Plankthotrix*, les

gènes *mcy* sont organisés en une seule unité de transcription, donc un unique sens de transcription (Rouhiainen et al., 2004).

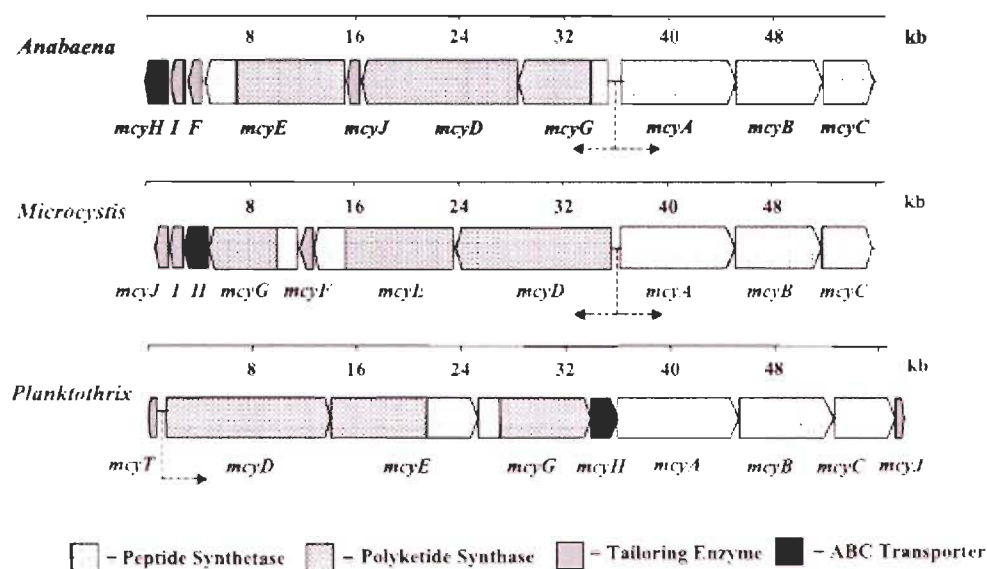


Figure 3.2 : Organisation des gènes *mcy* des genres cyanobactériens *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix* (Dittman et al., 2005)

3.2.2 Contrôle génétique de la catalyse des microcystines

3.2.2.1 La régulation de l'expression des gènes impliqués dans la formation des microcystines

Tandis que certains chercheurs ont dosé les microcystines synthétisées dans le but de comprendre la régulation générale de la production des microcystines (Chapitre 2, section 2.2.1), d'autres ont affiné la recherche en analysant, cette fois au niveau moléculaire, les transcrits des gènes *mcy* (Martin-Luna et al., 2006; Sevilla et al., 2008). Ces analyses ont servi à comprendre la régulation de la transcription de gènes codant pour les microcystines synthétases. La transcription des gènes *mcy* est faite à partir de deux sites d'initiation chez *Microcystis* et *Anabaena*, et produit donc deux unités polycistroniques : *mcyABC* et *mcyDEFGHIJ*. Chez *Planktothrix*, la transcription se fait à partir d'un seul site d'initiation. Elle ne produit donc qu'une seule unité polycistronique. Toutefois, il a été observé que la plupart des gènes *mcy* (*mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, *mcyH*,

mcyI et *mcyJ*) possédaient également leurs propres séquences promotrices (Kaebernick et al., 2000), modulant alors certainement la transcription au niveau de chacun de ces gènes.

Chez *Microcystis aeruginosa*, la transcription des gènes *mcy* est sensible aux variations d'intensité lumineuse (Kaebernick et al., 2000; Dittmann et al., 2001). En effet, le nombre de transcrits issus des gènes *mcy* est plus élevé lorsque l'intensité lumineuse est forte et lorsque sa longueur d'onde est comprise entre 620 et 666 nm (lumière rouge). Il a également été démontré chez *Microcystis* que la région promotrice principale des gènes *mcy* (entre *mcyD* et *mcyA*, voir figure 3.2) comprenait des séquences similaires aux motifs *fur* (Martin-Luna et al., 2006). La fonction de la protéine Fur (Ferric Uptake Regulation) est de réguler les mécanismes d'acquisition du fer en se fixant sur les régions promotrices de gènes codant pour des sidérophores, inhibant alors leur synthèse. La présence de ces séquences *fur* dans l'opéron *mcy* suggère donc l'implication de la protéine Fur dans la régulation de la transcription des microcystines (Martin-Luna et al., 2006).

Cependant, afin d'analyser globalement la régulation de la synthèse des microcystines, il faudrait également tenir compte de la régulation post-traductionnelle des microcystines synthétases. Pour l'instant, les recherches traitant de la régulation génétique des microcystines ont uniquement ciblé la régulation de la transcription des gènes *mcy*. Or, la catalyse des microcystines dépend évidemment des PKS et NPRS indispensables à leur synthèse, mais aussi de cofacteurs, comme la phosphopantetheine, une protéine nécessaire à l'activité des PKS et des NRPS (Pegram et al., 2008). Certains chercheurs pensent donc que des efforts devraient être dirigés vers la régulation des gènes codant pour ces cofacteurs afin de mieux comprendre leur rôle et leur importance dans la régulation des microcystines synthétases (Pegram et al., 2008).

Quoi qu'il en soit, tout comme l'effort fourni pour comprendre la régulation générale de la production de microcystines, celui consacré à la compréhension de la régulation de la transcription des gènes *mcy* reste insuffisant. Les facteurs et leurs

actions respectives impliquées dans la transcription des gènes *mcy* ne sont pas encore totalement connus.

3.2.2.2 Variabilité génétique : à l'origine d'isoformes de microcystines

L'existence d'isoformes de microcystines a d'abord été attribuée à la faible spécificité du substrat pouvant se lier au domaine d'adénylation des NRPS synthétisant les microcystines (d'où la grande variabilité d'acides aminés en position 2 et 4 des microcystines, Mikalsen et al., 2003). Seulement, il a depuis été démontré que la variabilité nucléotidique existant au niveau des gènes *mcy* était également impliquée dans la formation d'isoformes de microcystines.

Les recombinaisons génétiques (délétions, additions, transpositions) et les mutations ponctuelles sont la cause de la variabilité génétique existant au sein de l'opéron *mcy* entre les différentes espèces cyanobactériennes toxigènes (Tanabe et al., 2008; Tooming-Klunderud et al., 2008).

Cette variabilité au sein de l'opéron *mcy* participe aux variations d'isoformes de microcystines catalysées. D'ailleurs, Mikalsen et al. (2003) ont illustré ce phénomène en observant les conséquences suite à des événements de recombinaison au niveau des modules A des domaines *mcyB1* et *mcyC* sur la production de microcystines (Tooming-Klunderud et al., 2008). Les modules A des domaines *mcyB1* et *mcyC* (Figure 3.1) sont impliqués dans la reconnaissance et l'activation des acides aminés X et Z de la microcystine (position 2 et 4 de la microcystine, figure 3.1). Les auteurs ont constaté que les souches cyanobactériennes dont les gènes *mcyB1* et *mcyC* étaient mutés synthétisaient l'isoforme RR de la microcystine au lieu de l'isoforme LR (Mikalsen et al., 2003; Tooming-Klunderud et al., 2008). Ces résultats soutiennent donc l'implication de la variabilité génétique comme moteur de la production d'isoformes de microcystines.

3.2.3 Évolution temporelle des gènes *mcy*

3.2.3.1 Origine des gènes *mcy* présents chez les cyanobactéries toxigènes

Les gènes codant pour les microcystines synthétases (gènes *mcy*) ont été déjà détectés au sein de populations appartenant aux genres cyanobactériens *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Hapalosiphon* et *Nostoc*. Il existe donc au sein de ces genres des populations possédant les gènes *mcy* et d'autres ne les possédant pas. Cette distribution sporadique a été considérée selon deux origines possibles. La première hypothèse suggère que cette répartition irrégulière des gènes *mcy* au sein des populations cyanobactériennes serait la conséquence de transferts horizontaux récents entre populations toxigènes et populations non toxigènes (Mikalsen et al., 2003; Dittmann et Börner, 2005). La seconde hypothèse suppose que les gènes *mcy* étaient présents chez l'ancêtre commun à l'ensemble des cyanobactéries. Ainsi, les gènes *mcy* étaient à l'origine communs à toutes les cyanobactéries et les populations non toxiques auraient en fait perdu une partie ou l'ensemble des gènes *mcy*, les empêchant par conséquent de produire des microcystines (Rantala et al., 2004).

On constate de grandes similarités entre les complexes multienzymatiques catalysant les microcystines des genres *Microcystis*, *Planktothrix* et *Anabaena* (Dittmann et Börner, 2005), mais l'organisation des gènes *mcy*, codant donc pour ces complexes multienzymatiques, diffère significativement entre ces trois mêmes genres (Figure 3.2). On peut citer à titre d'exemple les différences qu'il existe entre la position des gènes codant pour les « tailoring enzyme » (McyF, McyI, McyJ) ou celle du présumé transporteur ABC (mcyH) (Figure 3.2) (Dittmann et Börner, 2005). De plus, deux de ces gènes codant pour les « tailoring enzyme », McyF et McyI, sont absents chez *Planktothrix* (Christiansen et al., 2003), et enfin, les origines de transcription au sein de l'opéron *mcy* ainsi que l'ordre des gènes *mcy* ne sont pas conservés entre les génomes des genres *Microcystis*, *Planktothrix* et *Anabaena* (Figure 3.2). Selon Dittmann et Börner (2005), ces différences importantes existant dans l'organisation de ces trois opérons *mcy* ne soutiennent pas l'idée d'un transfert horizontal récent entre les trois genres. De plus, aucune donnée n'a pu, jusqu'à présent, prouver l'existence de

transferts horizontaux entre des genres cyanobactériens toxigènes (Tooming-Klunderud et al., 2008; Fewer et al., 2007; Rantala et al., 2004).

A fortiori, il a été démontré que la distribution sporadique de l'opéron *mcy* au sein des genres cyanobactériens n'était pas due aux transferts horizontaux entre les genres cyanobactériens, mais bien à la perte de la capacité à produire des microcystines chez certaines lignées (Rantala et al., 2004; Christiansen et al., 2008). Le haut niveau d'analogie en termes de divergences de séquences ADN entre deux gènes conservés (*ADNr16S* et *rpoCI*) et les gènes de l'opéron *mcy* a permis de conclure à une origine ancienne des gènes *mcy* (Rantala et al., 2004), laissant alors envisager que ces trois ensembles de gènes auraient co-évolué depuis l'apparition des microcystines (Rantala et al., 2004). Par ailleurs, la similarité de divergence entre les séquences ADN codantes pour les PKS et NRPS de l'opéron *mcy* et les gènes conservés *ADNr16S* et *rpoCI* atteste de l'origine ancienne de la collaboration entre les deux systèmes de synthétases dans la catalyse des microcystines (Rantala et al., 2004).

3.2.3.2 Transition naturelle des populations cyanobactériennes vers un état non toxique

Le fait que certaines populations cyanobactériennes des genres *Microcystis*, *Planktothrix* ou encore *Anabaena* soient incapables de produire des microcystines provient donc, d'après l'étude de Rantala et al. (2004), de la perte de l'information génétique nécessaire à sa synthèse (gènes *mcy*).

Une étude réalisée par Christiansen et al. (2008) appuyait cette idée en révélant que 25 souches cyanobactériennes non productrices de microcystines possédaient un vestige de gènes *mcy* (sur les 25 souches cyanobactériennes étudiées). Ils en ont déduit que la délétion de certaines parties des gènes *mcy* aurait causé cette incapacité à produire des microcystines. Ils ont également observé que ce vestige de gènes *mcy* possédait des séquences répétées inversées, ainsi que des séquences ayant de fortes similarités avec des gènes codant pour des transposases, proches de la région 3' du groupe de gènes *mcy* (Tillett et al., 2000; Moffitt et Neilan, 2004). La compilation de ces observations les ont

amenés à penser que la perte de la synthèse de microcystines était due à une délétion dans le cluster de la microcystine synthétase, causée initialement par l'insertion de transposons (séquences IS, transposition conservative) dans les gènes *mcy* (Craig, 1984; Christiansen et al., 2008).

3.2.3.3 Hypothèses des fonctions premières des microcystines

Dans cette étude, c'est la toxicité des microcystines envers les hépatocytes qui nous a intéressés. En effet, les microcystines possèdent une affinité pour les protéines phosphates hépatocytaires 1 et 2A (PP1 et PP2A), leur permettant de se fixer spécifiquement à ces dernières et de les inactiver. Cependant, au moment où les cyanobactéries sont apparues (il y a au moins 2,4 milliards d'années), les hépatocytes n'existaient pas. Pourtant, les gènes *mcy* ont été conservés par de nombreuses populations cyanobactériennes et elles continuent de catalyser ces microcystines, bien que cette synthèse soit un processus énergétiquement coûteux pour la cellule (Neilan et al., 2008). De par cette conservation génétique depuis 2,4 milliards d'années, on peut donc supposer que les microcystines jouent, et depuis leur origine, un rôle essentiel dans la survie des cyanobactéries. Comme avancé par Neilan et al. (2008), la compréhension de leur rôle original pourrait avoir des retombées importantes dans le domaine de la gestion de la qualité de l'eau.

Tout d'abord, Young et al. (2005) ont observé que les microcystines étaient principalement localisées dans les thylacoïdes et autour des granules de polyphosphates. Cette association avec les thylacoïdes, couplée avec le fait que la régulation de la transcription des microcystines est sensible à l'intensité lumineuse (Kaebernick et al., 2000), permet d'envisager l'implication des microcystines dans la réalisation de la photosynthèse cellulaire.

Ensuite, un rôle extracellulaire des microcystines est supporté par la similarité de la séquence *mcyH* avec les gènes codant pour des membres de la famille des transporteurs ABC (Tillett et al., 2000). McyH permettrait donc l'exportation des

microcystines vers le milieu extracellulaire. Un des rôles extracellulaires des microcystines pourrait être défensif. En effet, selon une hypothèse soutenue par Neilan et al (2008) dans « The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity », les microcystines pourraient avoir un rôle défensif pour les cyanobactéries les produisant car ces dernières les empêcheraient d'être digérées par le zooplancton. Neilan se base sur une observation réalisée par DeMott (1991) « les cellules cyanobactériennes sont généralement une source de nourriture pauvre pour le zooplankton et sont souvent sélectivement évitées au profil d'autres membres du phytoplancton », ce qui pourraient être causé par la production de toxines cyanobactériennes.

Une autre fonction extracellulaire des microcystines pourraient être une fonction de chélateur à visé nutritive. En effet, les souches productrices de microcystines possèdent un système d'acquisition du fer plus efficace que les souches non toxiques (Utkilen et Gjølme, 1995). Lorsque le milieu dans lequel se développent les cyanobactéries est appauvri en fer, on observe une augmentation de la transcription des gènes *mcy* ainsi qu'une augmentation de la production de microcystines (Lukac et Aegerter, 1993; Sevilla et al., 2008). Il a finalement été démontré que les microcystines étaient des chélateurs intracellulaires de Fe^{2+} , et que la transcription des gènes codant pour les microcystines synthétases était possiblement contrôlée par un mécanisme de régulation du fer (la région régulatrice entre *mcyA* et *mcyD* possède une affinité pour la protéine Fur, voir section 3.2.2.1) (Utkilen et Gjølme, 1995; Martin-Luna et al., 2006). Le rôle extracellulaire proposé par Tillett et al. (2000) pourraient donc être en lien avec les mécanismes d'acquisition du fer (les microcystines pourraient jouer un rôle de chélateur et capturer le fer dans le milieu extra-cellulaire).

3.3 Identification moléculaire à partir de gènes *mcy*

3.3.1 Principe de l'identification moléculaire

3.3.1.1 Introduction à l'identification moléculaire des bactéries

L'identification moléculaire des bactéries est possible par l'analyse de gènes dit « conservés ». Ces gènes présentent l'avantage d'exister chez l'ensemble des bactéries car le produit de ces gènes est indispensable au fonctionnement fondamental de la cellule (p. ex. l'ADN polymérase, impliquée dans la réplication du génome ou encore l'ARN polymérase, impliquée dans la transcription de l'ADN) (Gürtler et Stanisich, 1996; Patel, 2001). Par exemple, le gène de l'*ADNr16S*, qui code pour l'une des sous-unités des ribosomes bactériens, ou encore le gène *rpoC*, qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne. De par leur fonction irremplaçable dans la cellule, toute mutation survenant dans des régions importantes de ces gènes entraînerait la mort de la cellule, d'où la non-conservation des mutations « faux-sens » et « non-sens » dans la lignée cellulaire. Cependant, toutes les régions du gène ne sont pas indispensables. On observe d'ailleurs dans ces régions une plus grande variabilité dans la conservation de la séquence génétique. La diversité génétique existant au sein de ces régions variables permet de différencier les espèces bactériennes les unes des autres.

L'analyse du gène codant pour l'ARN16S est devenue un standard dans l'identification moléculaire de familles, de genres ou même d'espèces bactériennes (Woese, 1987; Neilan, 2002). Des réactions par PCR (Polymerase chain reaction) utilisant des amorces dont la séquence est complémentaire à une partie de région conservée permettent l'amplification de régions variables (situées entre deux régions conservées). Le séquençage de ces amplifications puis leur comparaison dans des banques de gènes (p. ex. GenBank, du NCIB) permet d'identifier l'espèce bactérienne dont elles proviennent.

3.3.1.2 Identification moléculaire des cyanobactéries

L'identification moléculaire des cyanobactéries nécessite une fois encore le ciblage de gènes conservés, existant cette fois uniquement chez l'ensemble des cyanobactéries. À titre d'exemple, on peut citer les gènes du groupe *nif* codant pour des sous-unités de la nitrogénase, une enzyme impliquée dans le cycle de l'azote (Roeselers et al., 2007), ou encore les gènes appartenant à l'opéron *cpc* codant pour la phycocyanine, un pigment impliqué dans la photosynthèse (Neilan et al., 1995). Il existe également des régions de l'*ADNr16S* spécifiques aux cyanobactéries : ces régions ont été soumises à des mutations depuis leur séquence d'origine, mais ces mutations sont portées par l'ensemble des cyanobactéries (elles étaient donc portées par l'ancêtre commun à l'ensemble des cyanobactéries).

Cependant, notre projet porte sur l'identification des cyanobactéries toxigènes. Caractériser une population cyanobactérienne avec des amorces ciblant l'*ADNr16S* (avec des amorces universelles) ou même l'*ADNr16S* cyanobactérien (avec des amorces ciblant spécifiquement l'*ADNr16S* des cyanobactéries) ne nous aurait pas avancés pour mettre en évidence des populations productrices de microcystines. Etant donné que l'opéron *mcy* préexistait chez toutes les cyanobactéries productrices de microcystines, nous nous sommes basés sur le caractère conservé de ce gène pour utiliser des amorces ciblant des régions conservées au sein de cet opéron, pour ainsi détecter et identifier moléculairement les producteurs potentiels de microcystines.

3.3.1.3 Identification moléculaire des cyanobactéries toxigènes

La présence des gènes codant pour les microcystines synthétases (*mcy*) permet donc à certaines populations cyanobactériennes de synthétiser comme type de métabolite secondaire des microcystines (Hotto et al., 2007). De nombreux travaux de caractérisation des gènes *mcy* ont été effectués. Ils ont abouti au séquençage des gènes *mcy* chez *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix*, les trois principaux producteurs de microcystines (Dittman et al., 2005). Ces travaux de séquençage ont ensuite permis la conception d'amorces PCR ciblant ainsi spécifiquement les cyanobactéries productrices

de microcystines. Des amorces PCR ciblant les gènes *mcyB* (Pan et al., 2002), *mcyA* (Hisbergues et al., 2003), *mcyE* (Rantala et al., 2004; Jungblut et Neilan, 2006) *mcyC*, *mcyD* et *mcyG* (Ouahid et al., 2005) ont pu être conçues grâce à ces travaux de séquençage. Ces amorces PCR permettent au final l'identification moléculaire de genres cyanobactériens toxinogènes, par analyses des amplifications PCR obtenues dans des banques de gènes.

À la suite de la mise au point de ces amorces ciblant les cyanobactéries productrices de microcystines, différentes études ont été effectuées, permettant alors la détection et l'identification moléculaire de cyanobactéries productrices de microcystines dans de nombreux pays : au Portugal (Saker et al., 2005), en Italie (Cappitelli et al., 2008), en France (Sabard et al., 2010), en Scandinavie (Vaitomaa, et al., 2003), en Allemagne (Hisbergues et al., 2003), en Pologne (Mankiewicz-Boczek et al., 2006), en Chine (Xu et al., 2008) et également en Amérique du Nord, notamment dans la région des Grands Lacs (Dyble et al., 2008; Hotto et al., 2007; Ouellette et al., 2006). Cependant, aucune étude de ce type n'a encore été faite au Canada, et encore moins au Québec.

3.3.2 Le gène *mcyE* : un gène adapté à la détection et à l'identification des cyanobactéries toxinogènes

Le gène *mcyE* représente 10464 pb des 55 kpb de l'opéron *mcy* (chez *Microcystis aeruginosa*) et code pour un polypeptide composé d'un domaine NRPS (non et d'un domaine PKS (Figure 3.3). Ce polypeptide, McyE, est responsable de l'étape finale de la biosynthèse de la fraction Adda de la microcystine, ainsi que de l'activation de l'acide aminé D-Glu et de son association avec Adda (Neilan, 2008; Tillett et al., 2000).

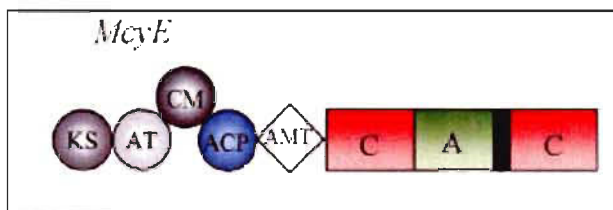


Figure 3.3 : Complexe enzymatique McyE. Les PKS sont schématisés par des cercles et les NPRS par des rectangles. Domaines abrégés : AT (acyltransferase), KS (β -ketoacyl synthase), ACP (acyl carrier protein), CM (C-methyltransferase), AMT (aminotransferase), A (aminoacyl adenylation), C (condensation) (Tillett et al., 2000).

Ce gène semble être un choix pertinent pour cibler les cyanobactéries potentiellement productrices de microcystines :

- La toxicité des microcystines contre les hépatocytes a été imputée à la fraction Adda combinée avec D-Glu (MacKintosh et al., 1990; Nishiwaki-Matsushima et al., 1991; Bourne et al., 1996; Campos et Vasconcelos, 2010). Or, McyE participe à la synthèse de la fraction Adda et associe D-Glu à la structure de la microcystine (Rantala et al., 2006). Le gène *mcyE* a donc un rôle central dans la toxicité de la microcystine.
- Ensuite, une étude comparant la détection de l'opéron *mcy* par amplification PCR de séquences ADN dans les gènes *mcyA*, *mcyB*, *mcyD* et *mcyE* avec le dosage par HPLC de microcystines produites révélait que *mcyE* était le meilleur marqueur moléculaire pour déterminer la présence de cyanobactéries potentiellement productrices de microcystines (Mankiewicz-Boczek et al., 2006). On peut supposer que ce meilleur résultat est dû à une conservation plus fidèle des séquences génétiques de *mcyE* comparée à celles de *mcyA*, *mcyB* et *mcyD* au sein des genres cyanobactériens, d'où une meilleure hybridation des amorces PCR sur le gène *mcyE*.

Des amorces ciblant ce gène ont déjà été modélisées par les équipes de Rantala et al. (2004) et de Jungblut et Neilan (2006). Les amorces HEPF/HEPR ciblent une séquence de 472 pb codant le domaine AMT de *mcyE* (Jungblut et Neilan, 2006)

(Annexe, page 90). Quant aux amorces *mcyE*-F2/*mcyE*-R4, elles ciblent une séquence de 812 pb codant en partie pour le domaine (A) de la NRPS du gène *mcyE* (Rantala et al., 2004) (Annexe, page 90).

3.4 Détection et identification moléculaire des cyanobactéries productrices de microcystines dans les lacs du Québec

Aujourd'hui, la détection des cyanobactéries productrices de microcystines au Québec est uniquement faite par microscopie et par dosage HPLC de trois isoformes de microcystines. Nous proposons d'identifier plus rapidement et de façon plus complète ces cyanobactéries par l'analyse de leur génome. Cette identification génomique nous apparaît d'autant plus importante puisque au sein d'une espèce cyanobactérienne, il existe des populations productrices de microcystines et d'autres non productrices. Donc une identification microscopique ne suffit donc pas à elle seule à définir le potentiel toxigène d'une population cyanobactérienne (Rouhiainen et al., 2004). Plus spécifiquement, nous proposons une identification moléculaire des cyanobactéries productrices de microcystines, basée sur le ciblage de gènes conservés et existant uniquement chez celles-ci.

Nous faisons l'hypothèse qu'une analyse basée premièrement sur une détection PCR du gène *mcyE* et deuxièmement sur une identification moléculaire par séquençage des amplifications PCR validée par la détection de marqueurs RFLP dans le gène *mcyE* serait plus efficace pour la détection et l'identification de cyanobactéries productrices de microcystines qu'un dosage par HPLC de quelques isoformes de microcystines et qu'une observation microscopique des espèces présentes dans l'échantillon.

Dans notre premier objectif, nous cherchons à détecter moléculairement les cyanobactéries productrices de microcystines. Cet objectif comprend les études de détection moléculaire par PCR du gène *mcyE*, validés par le dosage de trois isoformes de microcystines par HPLC-MS. Ces réactions PCR ont été faites à partir de l'ADN extrait des échantillons d'eau de lacs fournis par le MDDEP et grâce aux amorces PCR ciblant le gène *mcyE*. Le dosage de trois isoformes de microcystines par HPLC-MS est effectué

par les laboratoires du CEAEQ. Ce dosage des microcystines (comprenant les isoformes -LR, -RR et -YR) confirmant les résultats PCR est réalisé par chromatographie en phase liquide, couplé à une spectrométrie de masse (HPLC-MS). Les limites de cette détection varient entre 0,002 µg/l à 0,004 µg/l, selon les microcystines.

Notre second objectif vise à identifier les producteurs de microcystines. Il comprend une analyse « *in silico* » de marqueurs RFLP et une étude « *in vitro* » visant à valider les observations microscopiques des échantillons d'eau par la détection des RFLP dans l'ADN double digéré avec EcoRI et BsgI. Les observations microscopiques sont effectuées par les laboratoires du CEAEQ. Le dénombrement et l'identification des espèces cyanobactériennes est réalisé grâce à un microscope inversé. Les principaux ouvrages utilisés pour l'identification des cyanobactéries sont Komareck et Anagnostidis (1998, 2005) et Wehr (2003). Notre identification moléculaire basée sur l'étude des marqueurs RFLP est complétée par le séquençage et l'identification par BLAST (NCBI) de la séquence *mcyE* amplifiée et par une analyse phylogénétique à l'aide de séquences ADN obtenues à partir de celles répertoriées dans la banque de donnée GenBank.

Dans son ensemble, notre étude moléculaire vise donc à compléter les méthodes d'analyses déjà existantes au Québec. Jusqu'à présent, le CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec) du MDDEP (ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs) contrôle la production de microcystines en effectuant des dosages par HPLC-MS de trois isoformes des microcystines : la MCYST-LR, MCYST-RR et la MCYST-YR. Seulement, il a répertorié à ce jour 80 isoformes de microcystines (Hotto et al., 2007), donc ce test ne permet pas de détecter toutes les microcystines possiblement produites par les cyanobactéries. De plus, dans le cas où une population cyanobactérienne capable de produire l'une des trois isoformes de microcystines dosée serait présente dans le lac, le dosage des microcystines peut être négatif puisque leur production n'est pas constitutive (mais dépendante de certains facteurs environnementaux). Par conséquent, un résultat de dosage par HPLC négatif ne signifie pas forcément que le lac est sans risque, puisque si les conditions le permettent, la production et la relâche de microcystines peuvent avoir lieu quelques jours plus tard.

Par ailleurs, ce dosage est un contrôle post-synthèse de microcystines, il ne permet donc pas d'anticiper leur production future.

Le projet que nous présentons ici vise à répondre à la question : « Serait-il justement possible de mettre au point une méthode permettant d'anticiper la production de microcystines dans les lacs du Québec? ». Il a été démontré que la présence de gènes *mcy* était indispensable à la production de microcystines (Mankiewicz-Boczek et al., 2006). De plus, la catalyse de différentes isoformes de microcystines est une conséquence de la variation génétique qui existe au sein de l'opéron de la microcystine synthétase (Mikalsen et al., 2003). Par conséquent, une détection de ces gènes à partir d'eau de lacs du Québec informerait quant au potentiel de production des microcystines par les populations cyanobactériennes présentes, et ce, quel que soit le type de microcystines catalysées.

Ces travaux seront développés dans le Chapitre 4 : Detection and identification of microcystin-producing cyanobacteria in quebec's lakes by *mcyE* gene PCR.

CHAPITRE 4

DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICROCYSTIN PRODUCING CYANOBACTERIA IN QUEBEC'S LAKES BY *mcyE* GENE PCR

Dimitri Carrabin¹, Christian Bastien², Christian DeBlois², Maurice Boissinot³, and Marc Sirois^{1*}.

¹Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7; ²CEAEQ, Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Québec, Québec, Canada, G1P 3W8; ³Centre de Recherche en Infectiologie, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 4G2

* Corresponding author Phone: 819-376-5011 ext. 3999

Mail: marc.sirois@uqtr.ca

Contribution des auteurs de l'article

J'ai réalisé la majorité des travaux de biologie moléculaire mentionnée dans le document. J'ai également procédé à la rédaction de la version préliminaire de l'article scientifique en anglais sous la supervision de mon directeur de maîtrise, Marc Sirois, en vue de le soumettre à la revue «Microbial Ecology».

Maurice Boissinot a supervisé l'ensemble des analyses bio-informatiques. Christian Bastien et Christian DeBlois ont été les responsables des données d'observations microscopiques et d'analyses chimiques de détection des toxines de cyanobactéries.

Marc Sirois a été le directeur et superviseur des travaux de laboratoire en biologie moléculaire.

4.1 Summary and List of Abbreviations

Cyanobacteria are widely distributed in nature and freshwater cyanobacterial blooms occurrences are now a frequent worldwide phenomenon. Some bloom-forming species are capable of producing biologically active secondary metabolites such as cyanotoxins, from which microcystins (MCYST) are predominant, and are highly toxic to many eukaryotic organisms. Thus, release of cyanotoxins into different water supplies has major implications for public health. In order to determine if PCR analysis could be a sensitive and rapid technique to detect MCYST-producing cyanobacteria in freshwater samples and identify the MCYST-producer bacterial genus, we studied 25 water samples from Québec lakes previously recognized to be positive for microcystins.

PCR amplifications were performed using universal primers targeting the *mcyE* gene to generate 809-bp or 812-pb amplicons, depending of the cyanobacterial genus targeted. Amplicons from each samples were cloned in a plasmid and up to 10 recombinant plasmids for each sample were sequenced. Nucleotide data were analysed using Blast programs (NCBI). Computer analysis showed that 2 out of 3 commonly encountered MCYST-producing cyanobacterial genera (15/17, *Microcystis* sp., and 2/17 *Planktothrix* sp.) were responsible for the MCYST detected previously by HPLC; *Anabaena* MCYST producers were not detected in amongst the samples. PCR products RFLP-analysis using *EcoRV* and *BsgI* confirmed the same MCYST producers. Molecular genus identification was thus congruent with identification performed by microscopic cellular morphology.

Overall, the results showed that molecular data originating from a sample of problematic Québec lakes revealed that the production of MCYST is mainly caused by the genus *Microcystis* and to a lesser extent *Planktothrix*. Finally, *mcyE*-based PCR detection and identification proved to be a rapid and reliable method to identify cyanobacterial MC producers.

°C	Celsius degrees (°C)
μM	Micromoles by litre (μM)
μg	Microgrammes (μg)
mL	Millilitre (mL)
μL	Microlitre (μL)
MCYST	microcystin
LR, YR, RR	respectively, Leucin-Arginin, Tyrosin-Arginin, Arginin-Arginin
Tm	Melting temperature
Bp	Base pair

4.2 Introduction

Each year, the « Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs » of Québec (MDDEP, Ministry of Sustainable Development, Environment and Parks of Quebec) monitors various lakes for the presence of toxigenic cyanobacteria and particularly direct presence of microcystins. Microcystins (or hepatotoxin) can contaminate drinking water (Robert et al., 2005) and accumulate crops via irrigation water (Mohamed et al, 2009), and then be stored in the liver of some vertebrates consumed by humans, fishes, ducks and other birds (Chen et al., 2009). Finally, microcystins, by their strong hepatotoxicity, can be mortal toxins for animals (Oberholster et al, 2009) and for humans (Carmichael et al, 2001).

The routine inspections carried out by the MDDEP (microscopic observations and microcystins determinations by HPLC) are not useful to act upstream of the microcystins production, primarily because microcystins synthesis is not constitutive but regulated, depending on several environmental factors (light intensity, pH, concentration of nitrogen, phosphorus and metals) (Rantala et al., 2006; Pearson et al., 2008). In addition, microscopic identification of toxigenic cyanobacterial species is not feasible (Kurmayer et al., 2003; Rantala et al., 2006; Foulds et al., 2002; Dyble et al., 2008). In that situation, molecular detection and identification of a suitable gene-target could be useful to counter time-line imperatives.

The microcystins are catalysed by large multienzymatic complexes composed by polyketide and peptide synthetases: the microcystins synthetases (Dittman et al., 1997). These synthetases are encoded by the *mcy* genes cluster (*mcyA-D*, *mcyE* and *mcyG*) (Tillett et al., 2000). The *mcy* genes have been identified and sequenced from *Microcystis* (Tillett et al., 2000), *Anabaena* (Rouhiainen et al., 2004) and the *Planktothrix* genera (Christiansen et al. 2003). These studies lead to the modelling of various PCR primers (Rantala et al. 2004; Jungblut and Neilan, 2006). Among the numerous genes implicated in the microcystins synthesis, the *mcyE* gene, encoding synthetases catalyzing the amino acids responsible for the microcystins toxicity (Rantala et al., 2008), is a key gene to allow microcystins production (Boczek-Mankiewicz et al., 2006). Thus, we focussed on the *mcyE* gene as a key molecular marker to extrapolate microcystins detection.

To improve the water quality control of Quebec lakes, we developed a methodology to detect and identify potential cyanobacterial microcystins producers. This technique could allow faster alert-information about the risk of microcystins production associated to a cyanobacterial bloom. Sequencing the *mcyE* amplicons and bioinformatics analysis sequence comparisons allowed the microcystins-producer identification to the species level. In routine laboratory analysis, microscopic observations of water samples generally identifies mix of commonly encountered cyanobacterial genera, e.g. *Microcystis*, *Planktothrix* and *Anabaena* (Robert et al., 2008), but without being able to precisely pinpoint the toxin producer.

To resolve the latter problem, we also studied the polymorphism in the DNA amplicons generated from total DNA extracted from cyanobacterial toxic blooms. Observation of specific nucleotide changes within the *mcyE* fragment sequence between *Microcystis*, *Planktothrix* and *Anabaena* genera resulted in defining a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-PCR protocol. By restricting *mcyE* PCR amplicons with a combination of *EcoRV* and *BsgI* restriction enzymes, we propose a fast and effective technique to identify the microcystins producers within a mix of various cyanobacterial species.

4.3 Materials and methods

Environmental samples: The samples were collected from 14 lakes located in 7 different regions of the Province of Québec (Montréal, Saguenay, Abitibi-Témiscamingue, Chaudières-Appalaches, Estrie, Lanaudière and Outaouais). 500mL samples were collected during the summer of 2008 and 2009, as described by the MDDEP (Robert et al., 2008) and stored at 4°C until testing.

Microscopic observations: Enumeration and identification of cyanobacteria were performed by inversed microscopy (Nikon Eclipse), as already described (Utermöhl et al., 1958).

Microcystins analysis: The extracellular toxins were extracted by filtering 100 mL of sample in a octadecyl (C18) column, then eluted from the filter with a methanol + 1% CF₃CO₂H (trifluoroacetic acid) solution. The eluate was evaporated to dryness under argon atmosphere and then resuspended in 1 mL of solution. MCYST-LR, MCYST-YR, MCYST-RR were separated on a C18 liquid chromatography column by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) (Table 2). The detection limit was 0,02 µg/L for the MC-LR, 0,1 µg/L for MC-RR and 0,01 µg/L for MCYST-RR.

DNA extraction: One to 5 mL of each sample was centrifugated (15 000g for 1 min) to form a pellet, which was resuspended in 50µL of sterile nanopure water. DNA of the cellular pellet was extracted using PowerSoil™ DNA isolation kit (MO-BIO) following manufacturer's instructions. Purified DNAs were conserved at -20°C until used for molecular studies.

PCR analysis: To confirm the quality of the extracted cyanobacterial DNA, each DNA sample was tested by PCR amplification using specific 16S cyanobacterial primers, 27F1 and 809R (Table 1). Positive amplification showed the quality of extracted DNA which were then tested using the *mcyE* gene primers *mcyE*-F2 and *mcyE*-R4 primers pair (Table 1). PCR reactions were performed in a final volume of

50 µL, containing 0,025 U/µL of Taq DNA polymerase, 1X Thermopol Buffer, 0,3 µM of both primers, 200 µM of dNTPs (Deoxynucleotide solution mix), and 50 ng of DNA template (usually 1 uL). Reagents were from New England Biolabs.

Table 4.1
Primers pair targeting the cyanobacterial *16SrDNA* gene and the *mcyE* gene

Target	Primer Name	Séquence 5' - 3'	Tm ⁽¹⁾	Amplification size	reference
cyanobacterial <i>16SrDNA</i>	27F1 (forward)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55°	782 bp ⁽²⁾	T.P. Salmon, B.A. Neilan, unpublished
	809R (reverse)	GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA			
	mcyE-F2 (forward)	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC	56°C	810 bp	A. Rantala, 2004
<i>mcyE</i>	mcyE-R4 (reverse)	AATTCTAAAGCCCAAAGA			

⁽¹⁾ Tm: melting temperature

⁽²⁾ bp: base pair

The amplifications were performed using a PTC-100 thermocycler (MJ Research) with the following protocol: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 25 cycles (with 27F1/809R primers pair) or 40 cycles (with mcyE-F2/mcyE-R4 primers pair) at 94°C for 30 seconds, 55°C (with 27F1/809R primers pair) or 56°C (with mcyE-F2/mcyE-R4 primers pair) for 30 seconds and finally at 72°C for 1 minute. A final elongation has been added at 72°C for 10 minutes. An aliquot of 5 µl of each PCR products was submit to electrophoris in a 0,8% LE-agarose with 2% Sybr[®]Safe (Invitrogen). Results (presence of amplicons) were visualized under UV light.

Clone library generation: *mcyE* PCR amplicons were purified with MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), following manufacturer's instructions. Purified amplicons were cloned using the pGEM[®]-T Vector System (Promega corp.). Ligated molecules were introduced into *E.coli* strain NEB5α (NEB) via electroporation as described in the *E. coli* Pulser manual (Bio-Rad). Transformed bacterial cells were plated on LB-agar

containing ampicillin at 100µg/ml and incubate at 37°C for 16 hours. Up to 25 colonies were randomly selected and purified on the same medium and conditions. Presence of the insert was first verified by cracking (Sambrook et al., 1982). Recombinant plasmids (appropriate size insert-positive) for sequencing were extracted and purified with the Qiaprep® Spin Miniprep kit (Qiagen).

Sequencing and bio-informatics: Sequencing was performed by the Biomolecular Analysis Platform of Laval University (Quebec City, Canada) using the T7 promoter primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Resulting DNA sequences were corrected with FinchTV software (version 1.4.0, Geopiza Inc.) and analysed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in the GenBank database (NCBI).

Phylogenetic analysis: Corrected *mcvE* sequences were aligned with the MEGA (V.4.0) software. In order to establish a representative phylogeny of the toxinogenic cyanobacteria group, 29 reference *mcvE* sequences of the genera *Microcystis*, *Anabaena* and *Plankthotrix* were selected in the GenBank database (NCBI). Phylogeny analysis of aligned *mcvE* sequences was done with the MEGA (V.4.0) software (Tamura et al. 2007). A Neighbor Joining Tree, based on the maximum composite likelihood method (Tanabe et al., 2009; Tooming-Klunderud et al., 2008) was constructed. This tree model was selected in order to evaluate the evolutive distances between the *mcvE* sequences of the alignment (Tanabe et al., 2009; Tooming-Klunderud et al., 2008). The bootstrap test (1000 rebuilds) was used in order to evaluate the statistical reliability of tree nodes.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis: The restriction endonucleases selection was based on *in silico* analysis of the *mcvE*-F2/*mcvE*-R4 DNA amplicon sequence of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (AF183408.1), *Plankthotrix agardhii* NIVA- CYA 126 8 (AJ441056.1) and *Anabaena sp. 90* (AJ536156.1) species using NEBcutter (V2.0) software (NEB). This restriction endonucleases selection was confirmed by the alignment of 29 *mcvE* sequences belonging to *Microcystis*, *Anabaena* and *Plankthotrix* genera (Mega software, V4.0). Finally, the purified PCR products

digestion was performed using enzymes *EcoRV* and *BsgI* (NEB). Restricted fragments were migrated and visualized on 1.5% agarose gel.

4.4 Results

4.4.1 Detection of potentially microcystins producer cyanobacteria

Microcystins dosage: the dosage of 3 microcystin isoforms (MCYST-LR, MCYST-RR et MCYST-YR) was performed by HPLC-MS (Table 4.2). In all sample, microcystins production was very heterogeneous. However, the microcystins concentration in Q39 and in Q915 was very high (254 and 158 µg/L), while the average microcystins concentration in other samples was 10,5 µg/L. The most toxic microcystin, MCYST-LR (Funari and Testai, 2008; Jaiswal et al., 2008) was the most commonly found: it was detected in 73% of the HPLC-MS positive microcystins samples, while MCYST-YR and MCYST-RR was respectively detected in 20% and 26% of the positive microcystins samples. The Q35, Q50, Q76 and Q21 samples dosage were (Table 4.2). Consequently, there are no microcystin in these samples, or presence at sub-detection levels. MYCST-LR concentrations of 64% of the samples were higher than the toxicity threshold of MCYST-LR established by Health Canada (1,5 µg/L).

mcyE gene detection by PCR: Microcystins producers detection was validated by a PCR amplification of a 810 bp fragment in the *mcyE* gene. Results of the PCR amplifications were compared with the dosage results of the 3 microcystin isoforms (Table 4.2). The PCR results were positive for all the samples where the microcystins were detected (Table 4.2). For the samples where the microcystins dosages were negative (Q35, Q50, Q76, Q21), we observed 2 types of results. For Q76 and Q21, PCR results were negative, but for Q35 and Q50, PCR results were positive (Table 4.2).

In order to prove the effectiveness of PCR detection of toxigenic cyanobacteria, the *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 PCR amplifications were sequenced. The samples contained possibly several toxic species. We therefore created a *mcyE* clone library before the sequencing step as 2 *mcyE* clones from each sample-library were sequenced.

Phylogenetic analysis of *mcyE* amplifications sequences results: Experiments aim to verify the relevance of the *mcyE* gene for the molecular identification of microcystins producers cyanobacteria. The 34 corrected sequencing results and 29 *mcyE* sequences of *Microcystis*, *Anabaena* and *Planktothrix* genera (Table 4.3) from Genbank database (NCBI) were aligned and placed in a Neighbor-joining phylogenetic tree (Figure 4.1). This tree allowed distinguishing the *Microcystis*, *Anabaena* and *Planktothrix* genera. Indeed, the *mcyE* sequences of each genus clustered without uncertainties in the tree, since the bootstrap test result for each first-junction is 100. This result showed that the 1000 trees generated by the software have all a first triple-branch separating the species of *Microcystis*, *Planktothrix* and *Anabaena* genera (Figure 4.1).

Molecular identification of microcystins producers: For each samples, sequencing results of the two *mcyE* clones was always the same. So, one of them was displayed in the table 4.3. The *Microcystis aeruginosa* genus was identified in 88% of positives samples targeting *mcyE* gene (Table 4.2). The *Planktothrix* genus was identified in 12% of *mcyE* gene positives samples. Finally, the *Anabaena* genus was never identified as a microcystins producer. The BLAST analysis of *mcyE* clones from Q911, Q89, Q101 and Q32 samples have identified the *Microcystis* genus, but this genus was never observed by microscopy in these samples (Table 4.2).

4.4.2 Identification of microcystin producers community among the genera *Microcystis*, *Anabaena* and *Planktothrix*

Study *in silico*, RFLP analysis validation by EcoRV and BsgI: Microcystins producers identification is based on the DNA sequence polymorphism bounded by the *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 primers, of the *Microcystis*, *Anabaena* and *Planktothrix* genera. The restriction cards of *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 DNA sequences from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (AF183408.1), *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126 8 (AJ441056.1) and *Anabaena sp.90* (AJ536156.1) species was performed with the NEBcutter (V2.0) software (data not shown). The restriction cards comparison has determined that the most appropriate restriction endonucleases to achieving the discrimination of toxigenics genera was BsgI. Only *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126 8 (AJ441056.1)

restriction site for BsgI was located too close to the 3' end of the DNA sequence targeted. Therefore, the distinction between a digested *Planktothrix mcyE* sequence and another undigested would have been difficult to establish. So the EcoRV restriction endonuclease has been added to efficiently discriminate the *Planktothrix* genus.

Before testing EcoRV and BsgI on mcyE-F2/mcyE-R4 PCR amplicons made from environmental samples DNA extractions, we verified the presence of the restriction endonuclease sites for EcoRV and BsgI on *mcyE* gene sequences from 29 species belonging to the *Microcystis*, *Anabaena* and *Planktothrix* genera (Table 4.3) by *in silico* analysis. This mcyE-F2/mcyE-R4 sequence alignments were first demonstrated a 3 bp difference in the sequence between the genus *Microcystis* (812 bp) and those of the *Anabaena* and *Planktothrix* genera (809 bp) (Table 4.3). This difference is reflected by the absence of an amino acid in the mcyE structure synthesised by the *Anabaena* and *Planktothrix* genera. Further studies are needed to determine whether this amino acid absence change or not the secondary structure of the catalyzed microcystin fraction (mcyE) or the microcystin affinity for hepatocytal phosphatase proteins. Then, these alignments confirmed the presence of the CTGCAC restriction site of BsgI at position 436 in the mcyE-F2/mcyE-R4 sequence for all the tested species belonging the *Microcystis* genus and at the position 491 for all the tested species belonging the *Anabaena* genus (Table 4.3). The second restriction site recognized by BsgI, GTGCAG, was present at position 17 of the *mcyE* sequences for all the tested species belonging *Planktothrix* and *Anabaena* genera. The GATATC restriction site of EcoRV was present at position 267 in the *mcyE* sequence for all tested species of the *Planktothrix* genus (Table 4.3). From the *mcyE* gene sequences alignment and endonuclease sites analysis of BsgI and EcoRV, we deduced the theoretical restriction profiles of mcyE-F2/mcyE-R4 sequences for the *Microcystis*, *Planktothrix* and *Anabaena* genera (Figure 4.2) by EcoRV and BsgI enzymatic digestion.

Study *in vitro*, *mcyE* gene RFLP analysis amplified by PCR from environmental samples DNA extracted: Having validated the RFLP analysis reliability by *in silico* studies, we tested *in vitro* with the DNA extracted from Quebec lakes water samples and

amplified by PCR. The microscopic observations of analysed samples have led to the *Microcystis* genus identification in 87% of samples, in the *Planktothrix* identification genus in 13% of samples and finally in the *Anabaena* genus identification in 53% of samples (Table 4.4). These three genera are known to be the microcystins producers the most common and important in the world (Hotto et al., 2007). In each sample, where the presence of microcystins was confirmed by assay, we analyzed by RFLP what was the composition of toxigenic cyanobacterial communities. Firstly, the results show that the experimental restriction profiles (Figure 4.3) correspond to the theoretical restriction patterns (Figure 4.2), confirming the *in silico* analysis reliability. After analyzing the experimental restriction patterns, we find that in 93% of samples, a single cyanobacterial genus per sample was the producer of microcystins: *Microcystis* or *Planktothrix*. The microcystins production is due to the *Microcystis* genus in 87% of samples, and *Planktothrix* genus in 13% of samples. (Figure 4.3, Table 4.4). However, in Q82 sample, RFLP can highlight both *Microcystis* and *Planktothrix* genera. On the other side, the *Anabaena* genus, although present in 53% of samples, has never been identified as microcystin potential producer.

4.5 Discussion

The main objective of the present work was to improve the diagnostic (detection and identification) of cyanobacterial microcystins producers in Quebec's lakes. Our results showed that the detection of microcystins producers by *mcyE* gene PCR amplification was effective and that the main producer was *Microcystis aeruginosa*.

4.5.1 Detection of toxinogenic cyanobacteria (microcystins producers)

The *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 primers have been used to detect toxigenic cyanobacteria from Finland and Poland environmental samples (Rantala et al., 2006; Mankiewicz-Boczek et al., 2006). In a study comparing the *mcyA*, *mcyB*, *mcyD* et *mcyE* genes, Mankiewicz-Boczek et al. (2006) demonstrated that the *mcyE* gene was the most sensitive gene to detect cyanobacterial microcystin producers. Nevertheless, PCR results

between two distant populations can differ and be caused by punctual mutations in the primers sequences. However, our results showed the effectiveness of the primer pair to detect microcystins producers from Quebec's lakes. No false negative was observed with the PCR-assay (Table 4.2).

On the other hand, the comparative study between HPLC toxins detection and *mcyE* gene PCR detection revealed 2 false positive samples, Q35 and Q50. Those samples were positive for *mcyE* PCR amplification while direct microcystins detection showed absence of the toxins. Some hypothesis has been proposed to explain such results. Tillett et al. (2001) suggested that a mutation in the *mcy* cluster could be responsible for the absence of microcystins production. The most likely evolutionary mechanism explaining the loss of capacity to synthesize the microcystins is a deletion in the *mcy* cluster and can be caused via the insertion of mobile elements (IS sequences) (Christiansen et al., 2008; Kurmayer et al., 2004). Though, a *mcyE* gene containing a deletion could still produced a PCR amplicon while ceasing the production of toxins. A second explanation relies on the fact that only 3 isoforms of microcystins were assayed (MCYST-LR, MCYST-RR et MCSYT-YR), while in fact there exist 80 different isoforms of microcystins (Hotto et al. 2007). Considering the latter information, microcystins potentially synthesized by the cyanobacterial population in the Q35 and Q50 samples could be different from the 3 dosed microcystins. Another possibility relies on gene regulation, as microcystins synthesis depends on the *mcy* genes expression. This regulation is dependant of environmental factors (Kotak et al., 2000; Sivonen et al., 1990). Influence of temperature, pH, light intensity, as nitrogen, phosphorus and iron concentrations on modulation of microcystin synthesis were already described (Martin-Luna et al., 2006; Kotac et al., 2000). For the Q35 and Q50 samples, the microcystins synthesis could have been inhibited or low-regulated by environmental conditions, impairing detection.

4.5.2 Identification of toxins producers

Phylogenetic analysis of *mcyE* sequences (Figure 4.1) were made to confirm the molecular identification of toxigenic cyanobacteria based on the *mcyE* gene. The bootstrap result for the first triple-branch of the tree and the high score of identification by BLAST analysis (Table 4.2) suggested that the amplified sequence of *mcyE* gene allowed the molecular detection. Otherwise, the identified *Microcystis* and *Planktothrix* genera are some of the most commonly found microcystins producers of the world (Hotto et al., 2007). Furthermore, studies have demonstrated that the *mcy* cluster and the *16S rDNA* gene have a high degree of congruence and the same level of divergence. They also deduced that the microcystin synthetase genes were present in the last common ancestor of a large number of cyanobacteria. Our results support the work of Rantala et al. (2004) that showed that the molecular identification of toxigenic cyanobacteria from *mcyE* gene amplification is effective.

The *Microcystis* genus have been identified as the main microcystins producer in freshwater ponds (ponds, lakes) worldwide (Rantala et al., 2006; Hotto et al., 2007). Results of our BLAST analysis confirmed this information, as they showed that the *Microcystis aeruginosa* species was the main microcystins producer in the Quebec's lakes (for the analysed lakes) (Table 4.2).

As observed by Saker et al. (2008), some genera could be molecularly identified as microcystins producer without being observed by microscopy. In our study, the *Microcystis* genus has been identified as a microcystins producer in the Q911, Q101, Q89 and Q32 samples, but *Microcystis* cells haven't been observed in these samples (Table 4.2). The higher sensibility with the molecular identification compared to the microscopical identification explains the observed differences (Saker et al., 2008). The lowest abundance class for the microscopy detection was 200 to 500 cells/mL, while 10 cells/mL can be sufficient for PCR detection (Baker et al. 2002). Also, microscopical observation of the Q911 sample showed only *Aphanizomenon* genus cell with a positive HPLC microcystins dosage. Nevertheless, *Aphanizomenon* is not a microcystins producer (Funari et al. 2008; Neilan et al., 2008; Sivonen et al. 2008). A microcystins

producer was present in the Q911 sample but was not detected by microscopy. Another hypothesis to explain this positive result by PCR detection is the extracellular genomic DNA presence from cells normal lysis (Saker et al. 2008) not degenerated by DNAses and possibly amplified by PCR.

4.5.3 Identification of cyanobacterial community in Quebec lakes

Hisbergues et al. (2003) conducted an RFLP analysis from *mcyA* gene PCR amplicons and they have demonstrated the presence of toxigenic populations belonging to the *Microcystis* and *Planktothrix* genera. It was already showed that the *mcyE* gene was a toxigenic cyanobacteria detection marker more sensitive and more reliable than *mcyA* (Mankiewicz-Boczek et al., 2006). We report here the first study based on analysis of a DNA sequence polymorphism bounded by the *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 primers. *mcyE* primers hybridization allowed the amplification of a 809 base pairs (bp) fragment from the genome of *Anabaena* and *Planktothrix* and 812 bp from *Microcystis* genus. From these PCR products, we identified which of latter toxigenic cyanobacterial genera could be the main microcystins producers in Quebec's lakes. So once the presence of potentially microcystins producers cyanobacteria confirmed by PCR, their molecular identification will be done in a single enzymatic reaction.

Because we sought to analyze the cyanobacterial communities composition producing microcystins, water samples from lakes selected for this study were all positive for microcystin-LR,-RR or -YR (HPLC assays, data not shown). Therefore, the cyanobacterial community of these samples included at least one major microcystins producer. The restriction profiles (Figure 4.3) showed that the cyanobacteria populations responsible for microcystins production in Quebec's lakes belong to the *Microcystis* or *Planktothrix* genera. The *Anabaena* genus, although observed in 53% of samples (Table 4.4), has never been identified by RFLP. Since the *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 primers is able to detect the *mcyE* gene of the *Anabaena* genus (Rantala et al., 2004), even when the cell concentration of *Anabaena* populations is very low in the environmental sample (Mankiewicz-Boczek et al., 2006), presence of *Anabaena* would have been detected by RFLP analysis if ever present in the sample. To our knowledge, this is the first report on

mcy genes molecular analysis that was made in Quebec; however, some studies were held elsewhere in Canada (in the Great Lakes region; Hotto et al. 2007, for Lake Ontario and Dyble et al. 2008, for Lake Erie and Lake Huron). Also, the *Anabaena* genus was not identified as a microcystins potential producer, unlike *Microcystis* and *Planktothrix* genera.

In conclusion, the molecular detection by *mcyE* gene PCR allowed the estimation of microcystins production potential, this production being dependant of the environmental conditions, which was not evaluated in the present work. The molecular detection of microcystins producers would focus on the microcystins dosage in the Quebec's lakes (HPLC): the water from lakes where *mcyE* gene PCR testing would be negative could not be positive for HPLC assays. Moreover, in Quebec, microcystins production is largely due to the *mcy* genes expression of *Microcystis* genus, and very few from the *Planktothrix* genus. We have adapted a molecular tool to analyze toxigenic cyanobacterial communities by RFLP analysis of a *mcyE* gene sequences. Thereafter, additional sampling could be required to complete toxigenic cyanobacterial communities analysis of Quebec lake's. Finally, this analysis would lead to a better monitoring of the microcystins producers in Quebec's lakes.

4.6 Acknowledgments

This study was possible through the laboratory support of the "Centre d'Expertise en Analyses Environnementales du Québec" (CEAEQ, MDDEP) and internal financial support from FIR-UQTR (Fonds Institutionnel de Recherche de l'Université du Québec à Trois-Rivières) and GROEM (Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires de l'UQTR).

4.7 References

Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect.* 109(7):663-8.

Chen J, Zhang D, Xie P, Wang Q, Ma Z. (2009). Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Sci Total Environ.* 407(10):3317-22.

Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Börner T, Dittmann E. (2003). Microcystin biosynthesis in *planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol.* 185(2):564-72.

Christiansen G, Molitor C, Philmus B, Kurmayer R. (2008). Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Mol Biol Evol.* (8):1695-704.

Dittmann E, Neilan BA, Erhard M, von Döhren H, Börner T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol Microbiol.* 26(4):779-87.

Dyble Julianne, Gary L. Fahnenstiel, R. Wayne Litaker, David F. Millie, Patricia A. Tester. (2008). Microcystin concentrations and genetic diversity of *Microcystis* in the lower Great Lakes. *Environ Toxicol.* 23(4):507-516.

Foulds IV, Granacki A, Xiao C, Krull UJ, Castle A, Horgen PA. (2002). Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR. *J Appl Microbiol.* 93(5):825-34.

Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol.* 180(6):402-10.

Hotto AM, Satchwell MF, Boyer GL. (2007) Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. *Applied and Environmental Microbiology.* 73(14):4570-4578.

Jaiswal P, Singh PK, Prasanna R. (2008) Cyanobacterial bioactive molecules-an overview of their toxic properties. *Can J Microbiol.* 54(9):701-17. Review.

Jungblut AD, Neilan BA. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch Microbiol.* 185(2):107-114.

Kurmayer R, Kutzenberger T. (2003). Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol.* (11):6723-30.

Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T. (2004). Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol.* (8):831-41.

Mankiewicz-Boczek J, Izydorczyk K, Romanowska-Duda Z, Jurczak T, Stefaniak K, Kokocinski M. (2006). Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods. *Environ Toxicol.* 21(4):380-387.

Mohamed ZA, Al Shehri AM. 2009 Dec 15. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J Hazard Mater.* 172(1):310-5.

Neilan BA, Pearson LA, Moffitt MC, Mihali KT, Kaebernick M, Kellmann R, Pomati F. (2008). The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. *Adv Exp Med Biol.* 619:417-52. Review.

Oberholster PJ, Myburgh JG, Govender D, Bengis R, Botha AM. (2009). Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(4):1177-82.

Ouellette AJ, Handy SM, Wilhelm SW. 2006 Feb. Toxic *Microcystis* is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities. *Microb Ecol.* 51(2):154-165.

Pearson LA, Moffitt MC, Ginn HP, B A N. (2008) The molecular genetics and regulation of cyanobacterial peptide hepatotoxin biosynthesis. *Crit Rev Toxicol.* 38(10):847-56. Review.

Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M, Rouhiainen L, Vaitomaa J, Börner T, Sivonen K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(2):568-573.

Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, Lepistö L, Rintala J, Mankiewicz-Boczek J, Sivonen K. (2006). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl Environ Microbiol.* 72(9):6101-6110.

Rantala A, Rizzi E, Castiglioni B, de Bellis G, Sivonen K. (2008). Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip. *Environ Microbiol.* 10(3):653-664.

Robert C, Tremblay H., DeBlois C. (2005) Cyanobactéries et cyanotoxines au Québec : suivi à six stations de production d'eau potable (2001-2003). Direction générale des politiques (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs).

Robert C. (2008) Résultats de cyanobactéries et cyanotoxines à sept stations de production d'eau potable (2004-2006). Rapport de Direction des politiques de l'eau, Direction générale des politiques (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec).

Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *70*(2): 686-692.

Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol.* 7(10):753-64.

Utermöhl. H. (1958). Zur Vervollkommung der quantitative Phytoplankton. Methodik, Mitt. Int. Ver. Limnol. 9:1-38.

Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Møkelke L, Sivonen K. (2003). Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for microcystis and anabaena in lakes. *Appl Environ Microbiol.* 63(12):7289-7297.

4.8 Tables

Table 4.2

Microscopical observation and comparison between the concentrations of three microcystin isoforms versus the molecular identification based on sequencing BLAST analysis of the *mcyE* clones

Sample	Cyanobacterial genus identified by microscopy	Microcystins concentration (MCYST-X, µg/L)			PCR results <i>mcyE</i>	<i>mcyE</i> BLAST analysis		
		MCYST-YR	MCYST-LR	MCYST-RR		Cyanobacterial specie	Accession number	% ID
Q911	<i>Aphanizomenon</i>	Nd	0,63	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q913	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>	Nd	0,81	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	96
Q917	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i> , <i>Trichodesmium</i>	Nd	5,8	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q32	<i>Aphanizomenon</i> <i>Anabaena</i>	3,8	0,99	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF009552.1	99
Q101	<i>Aphanizomenon</i> <i>Anabaena</i>	0,02	Nd	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	97
Q915	<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i>	11	140	7	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q47	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i>	0,13	Nd	0,12	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q701	<i>Woronichinia</i> , <i>Anabaena</i> <i>Microcystis</i>	Nd	3,2	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q39	<i>Microcystis</i>	33	41	180	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	99
Q706	<i>Microcystis</i> , <i>Pseudoanabaena</i> <i>Woronichinia</i> , <i>Anabaena</i>	Nd	0,81	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB032549.2	99
Q88	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> <i>Pseudoanabaena</i> <i>Anabaena</i> , <i>Woronichinia</i>	0,97	6,7	11	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q35	<i>Microcystis</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Nd	Nd	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q60	<i>Plankothrix</i> , <i>Limnolothrix</i> , <i>Aphanizomenon</i>	7,3	Nd	Nd	+	<i>Plankothrix agardhii</i>	AJ441056.1	99
Q15	<i>Microcystis</i> , <i>Pseudanabaena</i>	Nd	26	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	97
Q50	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>	Nd	Nd	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q89	<i>Anabaena</i>	Nd	23	Nd	+	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF183408.1	98
Q82	<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Plankothrix</i> , <i>Woronichinia</i>	Nd	66	Nd	+	<i>Plankothrix</i> sp. 97	AY382552.1	99
Q76	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Caulerpinema</i> , <i>Pseudoanabaena</i>	Nd	Nd	Nd	-			
Q21	<i>Plankothrix</i>	Nd	Nd	Nd	-			

Nd: Not detected

Table 4.3

In silico study. Restriction sites and their position on the DNA sequence limited by the mcyE-F2/mcyE-R4 primers (The mcyE-F2/mcyE-R4 DNA sequences obtained via the GenBank database (NCBI) and aligned using MEGA V4.0 software).

Cyanobacterial strain	Version (GenBank, NCBI)	amplicon size (bp)	Restriction sites of BsgI		Restriction sites of EcoRV
			CTGCAC	GTGCAG	GATATC
<i>Microcystis aeruginosa</i> KB	EF426300.2	812	√ (436)		
<i>Microcystis aeruginosa</i> 973	DQ297455.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis aeruginosa</i> 972	DQ291139.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis</i> sp. 98	AY172537.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis</i> sp. 205	AY172517.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis</i> sp. GL260735	AY172531.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis</i> sp. IZANCYA25	AY172534.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB032549.2	812	√ (436)		
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	AP009552	812	√ (436)		
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	AF183408	812	√ (436)		
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7941	AY172536	812	√ (436)		
<i>Microcystis</i> sp. CTN10	FJ393327.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis</i> sp. CTN06	FJ393328.1	812	√ (436)		
<i>Microcystis viridis</i> NIES-102	EU151892.1	812	√ (436)		
<i>Planktothrix agardhii</i>	AJ441056.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Planktothrix agardhii</i>	AY172554.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Planktothrix agardhii</i>	AY172553.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Planktothrix agardhii</i> 213	EU151891.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Planktothrix rubescens</i>	AM990462.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Planktothrix</i> sp. 97	AY172552.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Planktothrix</i> sp. 213	AY172555.1	809		√ (17)	√ (267)
<i>Anabaena</i> sp. 299B	AY172550.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena</i> sp. 66A	AY172543.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena</i> sp. 18B6	EU151887.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena lemmermannii</i> 66A	EU151888.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena lemmermannii</i> 202A2/41	AY172546.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena</i> sp. 202A1	AY172545.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena</i> sp. 90	AY212249.1	809	√ (491)	√ (17)	
<i>Anabaena lemmermannii</i>	AY172544.1	809	√ (491)	√ (17)	

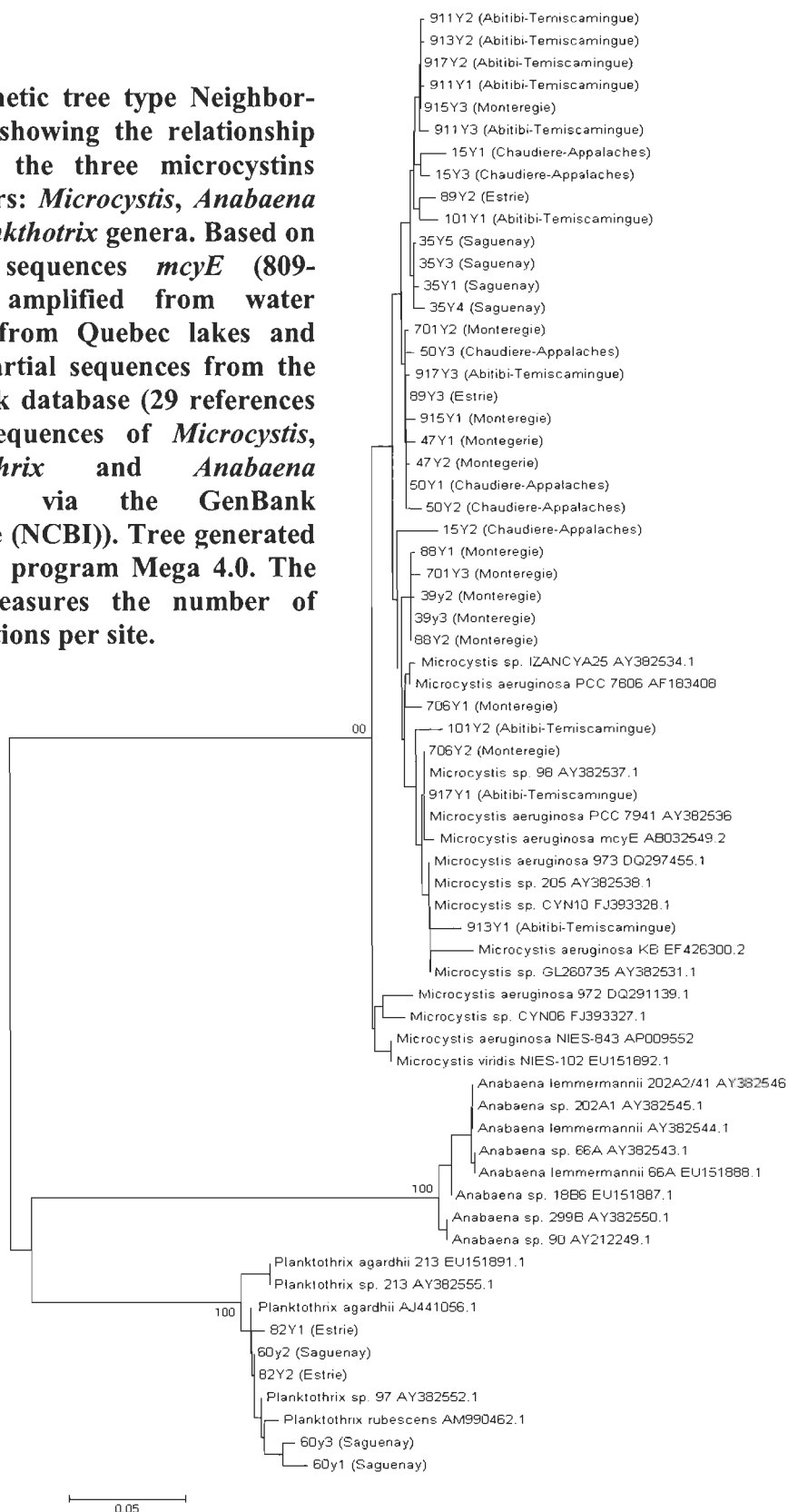
Table 4.4

Cyanobacterial genera observed by microscopy versus cyanobacterial genera identified by RFLP analysis of mcyE-F2/mcyE-R4 PCR amplicons

Sample	genus identified using microscopy	identified using RFLP (BsgI + EcoRV)	Sample	genus identified using microscopy	identified using RFLP (BsgI + EcoRV)
Q50	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>	Q894	<i>Microcystis</i> , <i>Woronichinia</i> <i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>
Q62	<i>Anabaena</i> <i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Woronichinia</i>	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i>	Q352	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i> <i>Woronichinia</i>	<i>Microcystis</i>
Q68	<i>Woronichinia</i> <i>Anabaena</i> <i>Microcystis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Pseudoanabaena</i>	<i>Microcystis</i>	Q706	<i>Microcystis</i> <i>Pseudoanabaena</i>	<i>Microcystis</i>
Q701	<i>Woronichinia</i> <i>Anabaena</i> <i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>	Q47	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>
Q917	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i> <i>Trichodesmium</i>	<i>Microcystis</i>	Q62	<i>Aphanizomenon</i>	<i>Microcystis</i>
Q08	<i>Anabaena</i> <i>Microcystis</i> <i>Woronichinia</i> <i>Aphanizomenon</i>	<i>Microcystis</i>	Q351	<i>Aphanizomenon</i> <i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>
Q91	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Woronichinia</i> <i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>	Q895	<i>Microcystis</i> <i>Woronichinia</i> <i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>
			Q60	<i>Planktothrix</i> <i>Limnospira</i> <i>Aphanizomenon</i>	<i>Planktothrix</i>

4.9 Figures

Figure 4.1: Phylogenetic tree type Neighbor-Joining showing the relationship between the three microcystins producers: *Microcystis*, *Anabaena* and *Plankthotrix* genera. Based on partial sequences *mcyE* (809-812pb) amplified from water sample from Quebec lakes and *mcyE* partial sequences from the GenBank database (29 references *mcyE* sequences of *Microcystis*, *Plankthotrix* and *Anabaena* obtained via the GenBank database (NCBI)). Tree generated with the program Mega 4.0. The scale measures the number of substitutions per site.



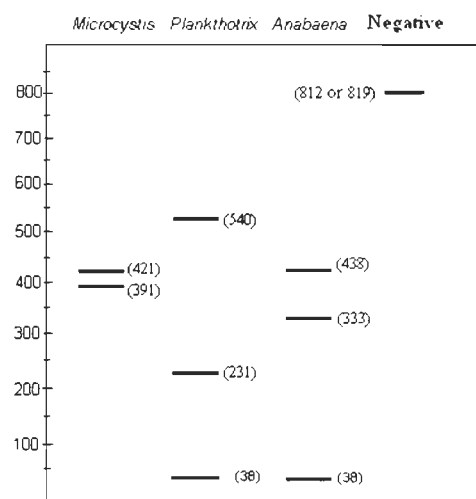


Figure 4.2: Theoretical restriction profiles obtained after alignment of sequences from the *mcyE* gene (Table 4.2). These profiles represent the *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 sequences digested by *EcoRV* and *BspI* restriction endonucleases. The number in brackets indicates the size of DNA fragment in base pairs (bp).

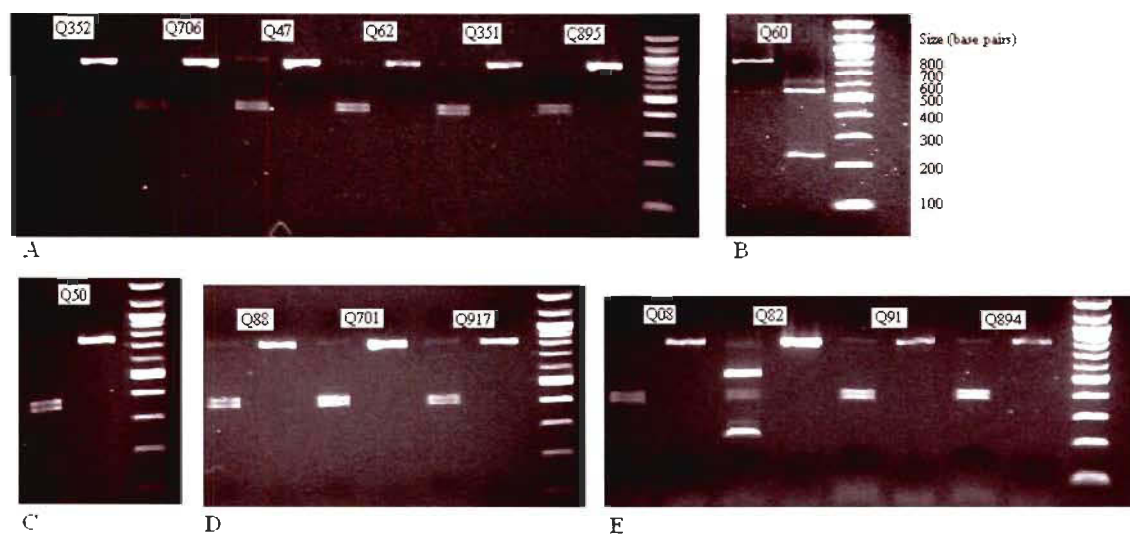


Figure 4.3: RFLP analysis of *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 PCR amplicons. The used PCR amplifications were made from DNA extracted from Q352, Q706, Q47, Q62, Q351 and Q895 (A), Q60 (B), Q50 (C) Q88, Q701 and Q917 (D) Q08, Q82, Q91 and Q894 (E) samples. For each sample, place it in a first well 150 ng of digested PCR products (*EcoRV* *BspI* +) and a second 150 ng of the same PCR products but undigested. Molecular weight marker: 100 bp ladder (NEB). The digested and undigested PCR products were loaded onto a 1.5% agarose gel.

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre objectif était de développer un outil moléculaire permettant la détection et l'identification des cyanobactéries productrices de microcystines dans les lacs du Québec. Cet outil permettrait tout d'abord d'évaluer le risque de production de microcystines dans les lacs, et ce, avant qu'elles ne soient dosables par les techniques d'analyse conventionnelles. Ensuite, il permettrait d'identifier quelles sont les populations cyanobactériennes à l'origine de leurs synthèse. L'identification des cyanobactéries productrices de microcystines est primordiale car elle permettrait au final d'être en mesure d'anticiper la possible production de microcystines lors des floraisons annuelles.

Pour identifier les populations toxigènes, nous avons dans un premier temps cloné et séquencé une série d'amplifications PCR issues du gène *mcyE*. L'analyse comparative entre les résultats de PCR ciblant le gène *mcyE* et les dosages de microcystines par HPLC ont tout d'abord démontré que la détection des cyanobactéries toxigènes par l'amplification du gène *mcyE* était efficace. L'identification moléculaire par séquençage et analyses bioinformatiques des amplicons PCR ont ensuite révélé qu'au Québec les microcystines sont principalement produites par l'espèce *Microcystis aeruginosa*. Dans un second temps, nous avons mis au point une analyse RFLP à partir de la séquence ADN amplifiée par PCR dans le gène *mcyE* (amorces *mcyE*-F2/*mcyE*-R4). Grâce à cette technique, nous avons pu identifier lesquels, parmi les genres *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix* observés par microscopie, étaient vraiment responsables de la synthèse de microcystines dans un lac donné du Québec, car contrairement à l'identification moléculaire par séquençage des produits PCR qui permet l'identification d'un producteur de microcystines, l'analyse RFLP permet d'identifier simultanément plusieurs genres toxigènes. Cette étude a ainsi démontré que la production de microcystines est due aux genres *Microcystis* et *Planktothrix*. Malgré le

fait que les populations du genre *Anabaena* soient observées dans de nombreux échantillons des lacs québécois et que le genre *Anabaena* soit connu pour être un producteur fréquent de microcystines, les populations du genre *Anabaena* analysées dans cette étude n'ont jamais été identifiées « productrices de microcystines ».

5.1 Détection des cyanobactéries productrices de microcystines

Le fait que la détection des cyanobactéries par l'amplification du gène *mcyE* n'ait révélé aucun faux négatif, c'est-à-dire que tous les échantillons positifs aux dosages de microcystines par HPLC aient également été positifs à la PCR ciblant *mcyE*, atteste que la région génétique ciblée était un bon marqueur pour détecter les cyanobactéries potentiellement productrices de microcystines provenant de lacs du Québec.

Par contre, notre étude comparative entre les dosages de microcystines par HPLC et la détection des populations productrices de microcystines par PCR à partir d'échantillons de lac québécois révèle vraisemblablement deux faux positifs. En effet, deux échantillons sur les dix-neuf testés ont été positifs à la PCR ciblant le gène *mcyE*, mais aucune isoforme de microcystines n'a été détectée par dosage dans ces mêmes échantillons. Cependant, un certain nombre d'hypothèses expliquent ce résultat. Comme Tillett et al. (2000) l'avaient déjà envisagé, une mutation dans le groupe de gènes codant pour la microcystine synthétase pourrait être responsable de cette absence de microcystines dans l'échantillon dosé. D'après ces derniers, le mécanisme évolutif responsable de la perte de synthèse de microcystines par les populations cyanobactériennes serait une délétion dans les gènes codant pour la microcystine synthétase causée par l'insertion d'éléments mobiles (séquences IS, transposition conservative) (Christiansen et al., 2008). Donc si la délétion inhibant la synthèse de microcystines a eu lieu dans une des régions génétiques couvertes par l'ensemble des gènes *mcy* mais autre que *mcyE*, la détection par réaction PCR aurait pu se faire, alors que la synthèse de microcystines aurait été inhibée. Toutefois, le dosage des microcystines n'a été fait que sur trois des isoformes existantes (à savoir MCYST-LR, MCYST-RR et MCSYT-YR). Seulement, il a été dénombré plus de 80 variants de la

microcystine (Hotto et al., 2007). Il est donc possible que les microcystines catalysées par les populations cyanobactériennes détectée par PCR dans ces deux échantillons soit une des 77 autres isoformes existantes. Enfin, la synthèse de microcystines est dépendante de l'expression du cluster de la microcystine synthétase qui lui, est soumis à une régulation par des facteurs environnementaux (Sivonen, 1990; Kotac et al., 2000; Martin-Luna B et al., 2006). Ces facteurs, tels que l'intensité lumineuse, le pH, la température, la concentration du milieu en azote, en phosphore et la présence de métaux (en trace généralement), modulent la synthèse de microcystines. Il était donc possible que la synthèse de microcystines ait été inhibée par les conditions environnementales, malgré le fait que les gènes *mcy* soient présents, dans toute leur intégrité, dans le génome des populations cyanobactériennes observées.

5.2 Identification des cyanobactéries productrices de microcystines

L'analyse phylogénétique a été réalisée afin de donner de la pertinence à l'identification des producteurs de microcystines basée sur les amplifications PCR de 812 pb ou 809 pb issues du gène *mcyE*. Le résultat du test de bootstrap des trois premières branches de l'arbre (Figure 4.1), ainsi que le pourcentage de correspondance de l'identification des clones du gène *mcyE* par l'analyse BLAST (Tableau 4.2, colonne % ID) suggèrent que la séquence amplifiée dans le gène *mcyE* permet l'identification moléculaire. Ces résultats de bioinformatique, appuyés par ceux de Rantala et al. (2004), démontrent que l'identification moléculaire de cyanobactéries toxinogènes issues de lacs québécois à partir du gène *mcyE* est valide. La construction de cet arbre phylogénétique nous a permis de mieux valider notre premier objectif, à savoir la détection moléculaire du gène *mcyE* pour détecter des producteurs de microcystines.

Le genre *Microcystis* a été identifié comme étant le producteur majoritaire de microcystines dans les bassins d'eau douce (étangs, lacs) du monde entier (Rantala et al., 2006; Hotto et al., 2007). Les résultats de nos analyses BLAST confirment cette information au niveau des lacs du Québec, étant donné que l'espèce *Microcystis aeruginosa* a été identifiée dans 88 % des séquençages des amplicons *mcyE*

(Tableau 4.1). Bien que le genre *Anabaena* ait été présent dans plusieurs de nos échantillons (Tableaux 4.2 et 4.3), il n'a jamais été identifié comme producteur de microcystines. Pourtant, des populations toxigènes du genre *Anabaena* sont communément trouvées dans d'autres régions du monde (Rantala et al., 2006).

Enfin, comme Saker et al. (2008) l'avaient déjà observé lors de la comparaison entre leurs résultats d'identification microscopique et d'identification moléculaire, certains genres cyanobactériens ont été identifiés par séquençage de produits PCR alors qu'ils n'avaient pas été observés par microscopie. Dans notre étude, le genre *Microcystis* a été moléculairement identifié comme producteur de microcystines dans plusieurs échantillons, bien que ce genre n'y ait jamais été observé par microscopie (Tableau 4.2). Les différences observées s'expliqueraient par la sensibilité de détection supérieure de la PCR par rapport à celle de la microscopie (Saker et al., 2008). Alors que les plus faibles classes d'abondance observées sont comprises entre 200 et 500 cellules/mL, Baker et al. (2002) rappellent qu'une concentration de 10 cellules/mL suffit pour avoir une détection par réaction PCR. De plus, Mankiewicz-Boczek et al. (2006) ont déterminé que la détection des cyanobactéries toxigènes par le couple d'amorce *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 était très sensible (quelques µg de biomasse par litres d'eau suffisent à avoir un signal PCR positif). D'ailleurs, l'observation microscopique de l'échantillon Q911 révèle uniquement la présence du genre *Aphanizomenon* (Tableau 4.2) et le dosage HPLC indique la présence de microcystines dans ce même échantillon. Une hypothèse possible serait que la population du genre *Aphanizomenon* identifiée dans cet échantillon produise des microcystines, mais ce serait tout de même surprenant étant donné le genre *Aphanizomenon* n'est pas considéré un producteur de microcystines (Funari et Testai, 2008; Neilan et al., 2008; Sivonen, 2008). Il paraît alors évident qu'un genre producteur de microcystines non identifié par microscopie devait être présent dans l'échantillon pour produire ces toxines. Cependant, une autre hypothèse expliquant l'identification moléculaire du genre *Microcystis* dans les échantillons où il n'avait pas été observé par microscopie pourrait être la présence d'ADN génomique extracellulaire résultant de la lyse normale de cyanobactéries possédant au moins le gène *mcyE* et présentes dans le même lac (hypothèse proposée par Saker et al., 2008). Cet ADN extracellulaire, qui

n'aurait alors pas été totalement dégradé par des DNases, aurait été amplifié lors de la réaction PCR.

Dans l'optique d'une meilleure connaissance des communautés cyanobactériennes toxigènes des lacs québécois, et à plus long terme d'une meilleure prévision de la production de microcystines, nous avons ensuite développé une technique moléculaire permettant d'identifier de façon simultanée, lesquels, parmi les genres *Microcystis*, *Plankthotrix* et *Anabaena*, étaient responsable de la production de microcystines dans les lacs du Québec.

Hisbergues et al. (2003) avaient réalisé une analyse RFLP en utilisant des amplifications du gène *mcyA* issues d'ADN extrait d'échantillons d'eau du lac Wannsee (Allemagne). Grâce à cette analyse RFLP, ils avaient mis en évidence la présence de populations productrices de microcystines, par contre il a depuis été démontré que le gène *mcyE* était un marqueur de détection des cyanobactéries toxigènes plus sensible et plus fiable que *mcyA* (Mankiewicz-Boczek et al., 2006).

Les résultats de cette analyse RFLP ont démontré que les populations cyanobactériennes responsables de la production de microcystines dans les 15 échantillons de lacs analysés appartiennent aux genres *Microcystis* et *Plankthotrix*. Le genre *Anabaena*, bien que présent dans 53 % des échantillons, n'a jamais été identifié par RFLP comme un producteur de microcystines. Etant donné qu'il a été démontré que les amorces *mcyE*-F2/*mcyE*-R4 détectent le gène *mcyE* des cyanobactéries du genre *Anabaena* (Rantala et al., 2004), et ce, même lorsque leur biomasse dans l'échantillon environnemental est très faible (Mankiewicz-Boczek et al., 2006), nous aurions dû détecter par la RFLP la présence de cyanobactéries toxigènes du genre *Anabaena* si ces dernières avaient existé dans l'échantillon. Au meilleur de nos connaissances, notre étude moléculaire basée sur l'analyse de gènes *mcy* est unique au Québec. Cependant, d'autres l'ont été dans la région des Grands Lacs (Hotto et al. (2007) au lac Ontario, et Dyble et al. (2008) au lac Erie et au lac Huron). Là encore, le genre *Anabaena* n'a

jamais été identifié comme producteur potentiel de microcystines, contrairement aux genres *Microcystis* ou *Planktothrix*.

Cette analyse RFLP confirme donc les résultats que nous avons eus par clonage et séquençage des amplicons PCR issus du gène *mcyE*, à savoir qu'au Québec, la production de microcystines est largement due au genre *Microcystis*, et dans une moindre mesure au genre *Planktothrix*. En fin de compte, nous avons développé un premier outil moléculaire, permettant de détecter la présence de producteurs potentiels de microcystines dans les lacs du Québec, et un second outil moléculaire permettant d'identifier les membres des communautés cyanobactériennes toxigènes des lacs du Québec parmi les trois producteurs de microcystines les plus fréquents au monde, à savoir les genres *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix*.

Pour conclure sur cette étude, la détection et l'identification moléculaires des cyanobactéries productrices de microcystines sont des compléments importants aux méthodes d'analyses des floraisons cyanobactériennes déjà mises au point et utilisées de façon routinière par les laboratoires du MDDEP. Le principal apport de la détection moléculaire par rapport à ce qui est déjà en place (observations microscopiques et dosage des microcystines -RR, -LR et -YR par HPLC-MS) est le gain de temps qu'il engendre. En effet, la détection moléculaire permet de signaler, et ce avant toute production de microcystines, quels sont les lacs contenant des populations toxigènes et donc susceptibles de produire des microcystines lorsque les conditions environnementales le permettront. Quant à l'identification moléculaire, elle permet, contrairement à l'identification réalisée par microscopie, de déterminer vraiment quelles sont les espèces responsables de la production de microcystines dans les lacs du Québec. Ces connaissances permettront de mieux analyser et maîtriser l'apparition de microcystines lors des futures floraisons dans les lacs du Québec.

5.3 Poursuite de projet

5.3.1 Étude des populations du genre *Anabaena* dans les lacs du Québec

Les populations cyanobactériennes appartenant au genre *Anabaena*, fréquemment présentes dans les lacs du Québec puisque régulièrement observées par microscopie, n'ont jamais été identifiées après séquençage des amplicons du gène *mcyE* ou encore par étude des profils de restriction après analyse RFLP. Nous en avons donc déduit que les populations du genre *Anabaena* présentes dans les échantillons d'eau de lacs analysés n'étaient pas capables de synthétiser de microcystines. Or le genre *Anabaena* fait partie des trois principaux producteurs de microcystines, il est donc d'un intérêt public de savoir si oui ou non on trouve des populations du genre *Anabaena* productrices de microcystine dans les lacs du Québec, afin de pouvoir prévenir de leur présence.

Le but de cet axe de recherche se diviserait en deux temps. Dans un premier temps, nous voudrions confirmer l'absence de populations toxigéniques du genre *Anabaena* dans les lacs du Québec afin de valider nos résultats préliminaires. Pour cela, il serait nécessaire de faire d'autres échantillonnages afin de tester la détection du gène *mcyE* à partir d'autres populations cyanobactériennes du genre *Anabaena*. Dans un second temps, nous voudrions comprendre pourquoi les populations du genre *Anabaena* présentes dans les lacs du Québec ne sont pas productrices de microcystines. Pour cela, nous ensemencerions sur gélose BG11-agar (Hein et al., 1998) un certain volume d'échantillons environnementaux provenant de lacs québécois, puis nous isolerions certaines colonies dont le morphotype correspond au genre *Anabaena*. À partir de ces colonies du genre *Anabaena*.

Le génome des colonies appartenant au genre *Anabaena*, incapables de produire des microcystines et dont l'amplification du gène *mcyE* aura été négative, sera étudié plus en détail. Nous nous baserons sur la théorie avancée par Christiansen et al. (2008) pour délimiter la ou les régions des gènes *mcy* touchées par des événements de transposition, et donc à l'origine de la perte de la production de microcystines par les populations du genre *Anabaena*. Par PCR, nous rechercherions donc quels sont les

vestiges de gènes *mcy* pour délimiter ces régions touchées par les modifications génétiques et rendant les populations québécoises du genre *Anabaena* non productrices de microcystines.

5.3.2 Élargissement des cyanotoxines visées : détection moléculaire des producteurs de saxitoxines, de cylindrospermopsines et des anatoxines

Hormis les populations cyanobactériennes productrices de microcystines, des populations connues pour produire des saxitoxines, des cylindrospermopsines et des anatoxines sont également observées dans des échantillons d'eau provenant de lacs québécois (Robert et al., 2008). De plus, le dosage des anatoxines a déjà été positif dans plusieurs de ces lacs (Robert et al., 2008). Tout comme les microcystines, ces autres hépatotoxines (cylindrospermopsines) ou neurotoxines (saxitoxines et anatoxines) peuvent représenter un danger pour l'homme.

Les gènes codant pour les synthétases catalysant la formation des saxitoxines, des cylindrospermopsines et des anatoxines ont déjà été partiellement séquencés (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2008; Méjean et al., 2009). De plus, des amorces PCR ciblant les gènes codant pour les synthétases de cylindrospermopsines ont déjà été conçues (Mihali et al., 2008).

Le but de cet axe de recherche serait la mise au point d'une puce ADN permettant la détection simultanée de producteurs potentiels de microcystines, de cylindrospermopsines, de saxitoxines et d'anatoxines. Dans un premier temps, nous confirmerions l'efficacité de notre test par puce ADN avec des cultures dont la synthèse de microcystines, de cylindrospermopsines, d'anatoxines ou de saxitoxine aura été confirmée (dosage des cyanotoxines par HPLC). Dans un second temps, nous effectuerions des échantillonnages dans les lacs du Québec puis détecterions la présence de producteurs potentiels pour toutes ces cyanotoxines. Nous pourrions d'une part détecter la présence des producteurs potentiels de cyanotoxines à partir d'une extraction d'ADN, et d'autre part détecter l'expression des gènes codant pour ces cyanotoxines à partir d'une extraction d'ARN total (convertit ensuite en ADNc pour des soucis de

conservation du matériel génétique). Les deux types d'acides nucléiques extraits (ADN et ARN convertis en ADNc) seraient ensuite hybridés séparément sur notre puce ADN et nous pourrions d'une part savoir quels sont les lacs contenant des populations de cyanobactéries producteurs de cyanotoxines et d'autre part savoir si ces cyanotoxines sont exprimés. Le tout serait confirmé par qPCR et dosage des cyanotoxines par HPLC.

Cette étude permettrait une avancée conséquente dans nos connaissances des communautés cyanobactériennes toxigènes des lacs du Québec. De plus, ces travaux permettront d'augmenter l'efficacité des analyses des cyanotoxines effectuées par les laboratoires du CEAEQ (MDDEP) puisque les dosages des différentes cyanotoxines pourront être effectués en fonction du résultat donné par la puce ADN. En effet, au lieu de doser systématiquement toutes les cyanotoxines, ce dosage pourra, dans le futur, être réduit aux cyanotoxines dont la possibilité de synthèse par les populations cyanobactériennes présentes dans l'échantillon aura été démontrée par la puce ADN. Au final, le développement de cette technique permettra une meilleure gestion des eaux de lacs ou potables au Québec.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams DG, Duggan PS. (2008) Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *J Exp Bot.* 59(5):1047-58. Review.
- Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, Riddles P. (1996). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl Environ Microbiol.* 62(11):4086-94.
- Bruno de Reviers. (2003) *Biologie et phylogénie des algues. Tome 2*, Belin (Belin Sup Sciences), Paris. ISBN 2-7011-3512-5.
- Burch MD. 2008 Effective doses, guidelines & regulations. *Ads Exp Med Biol.* 619:831-53.
- Callahan B, Thattai M, Shraiman BI. (2009) Emergent gene order in a model of modular polyketide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(46):19410-5.
- Campos A, Vasconcelos V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci.* 11(1):268-87.
- Cappitelli F, Abbruscato P, Foladori P, Zanardini E, Ranalli G, Principi P, Villa F, Polo A, Sorlini C (2008). Detection and elimination of cyanobacteria from frescoes: the case of the St. Brizio Chapel (Orvieto Cathedral, Italy). *Microb Ecol.* 57(4):633-9.
- Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect.* 109(7):663-8.
- Castenholz, R. W. (2001) Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition.* G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (eds.) Springer-Verlag, New York.
- Catherine A, Quiblier C, Yéprémian C, Got P, Groleau A, Vinçon-Leite B, Bernard C, Troussellier M. (2008). Collapse of a *Planktothrix agardhii* perennial bloom and microcystin dynamics in response to reduced phosphate concentrations in a temperate lake. *FEMS Microbiol Ecol.* 65(1):61-73. Epub 2008 May 6.

CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec) (2008), Les fleurs d'eau d'algues bleu-vert en 2008, Québec, MDDEP (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs).

Chen J, Zhang D, Xie P, Wang Q, Ma Z. (2009). Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Sci Total Environ.* 407(10):3317-22.

Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Börner T, Dittmann E. (2003). Microcystin biosynthesis in *planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol.* 185(2):564-72.

Christiansen G, Molitor C, Philmus B, Kurmayer R. (2008). Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Mol Biol Evol.* (8):1695-704.

Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management. London, E & FN Spon on behalf of WHO, p. 416.

Craig NL. (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet.* 22:77-105. Review.

Dadheech PK, Krienitz L, Kotut K, Ballot A, Casper P. (2009). Molecular detection of uncultured cyanobacteria and aminotransferase domains for cyanotoxin production in sediments of different Kenyan lakes. *FEMS Microbiol Ecol.* 68(3):340-50.

Dillon JG, Miller S, Bebout B, Hullar M, Pinel N, Stahl DA. (2009) Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community. *FEMS Microbiol Ecol.* 68(1):46-58.

Dittmann E, Börner T. (2005). Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 203:192-200.

Dittmann E, Erhard M, Kaebernick M, Scheler C, Neilan BA, von Döhren H, Börner T. (2001). Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology.* 147(11):3113-9.

Dittmann E, Neilan BA, Erhard M, von Döhren H, Börner T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol Microbiol.* 26(4):779-87.

Dittmann E, Wiegand C. (2006). Cyanobacterial toxins--occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res.* 50(1):7-17. Review.

Downing TG, Meyer C, Gehringer MM, van de Venter M. (2005). Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environ Toxicol.* 20(3):257-62.

Dyble Julianne, Gary L. Fahnenstiel, R. Wayne Litaker, David F. Millie, Patricia A. Tester. (2008). Microcystin concentrations and genetic diversity of *Microcystis* in the lower Great Lakes. *Environ Toxicol.* 23:507-516.

Edwards C, Lawton LA. (2009) Bioremediation of cyanotoxins. *Adv Appl Microbiol.* 67:109-29. Review.

Falkowski, P.G. Knoll, A.H. (2007) *Evolution of Primary Producers in the Sea.* China: Elsevier Academic Press.

Fay P. (1983) *The blue-greens*, London; Baltimore, Md., U.S.A.: E. Arnold.

Fewer DP, Rouhiainen L, Jokela J, Wahlsten M, Laakso K, Wang H, Sivonen K. (2007). Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evol Biol.* 7:183.

Foulds IV, Granacki A, Xiao C, Krull UJ, Castle A, Horgen PA. (2002). Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR. *J Appl Microbiol.* 93(5):825-34.

Funari E, Testai E. (2008) Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol.* 38(2):97-125. Review.

Genuário DB, Silva-Stenico ME, Welker M, Beraldo Moraes LA, Fiore MF. (2010) Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. *Toxicon.* 55(4):846-854.

Gürtler V, Stanisich VA. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 142 (1):3-16. Review.

Havens KE. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Adv Exp Med Biol.* 619:733-47. Review.

Hein S, Tran H, Steinbüchel A. (1998). *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch Microbiol.* 170(3):162-70.

Herfindal L, Selheim F. (2006). Microcystin produces disparate effects on liver cells in a dose dependent manner. *Mini Rev Med Chem.* 6(3):279-85. Review.

Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol.* 180(6):402-10.

Hotto AM, Satchwell MF, Boyer GL. (2007) Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4570-4578.

Humpage A. (2008). Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Adv Exp Med Biol.* 619:383-415. Review.

Hutchinson CR. (1999). Microbial polyketide synthases: More and more prolific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3336–3338.

Izaguirre G, Jungblut AD, Neilan BA. (2007). Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Water Res.* 41:492-498.

Jaiswal P, Singh PK, Prasanna R. (2008) Cyanobacterial bioactive molecules-an overview of their toxic properties. *Can J Microbiol.* 54(9):701-17. Review.

Jungblut AD, Neilan BA. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch Microbiol.* 185:107-114.

Kaebernick M, Neilan BA, Börner T, Dittmann E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol.* 66(8):3387-92.

Kleinkauf H, Von Döhren H. (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem.* 236(2):335-51. Review.

Kondo F, Ikai Y, Oka H, Ishikawa N, Watanabe MF, Watanabe M, Harada K, Suzuki M. (1992). Separation and identification of microcystins in cyanobacteria by frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon.* 30(3):227-37.

- Kotak BG., Angeline K-Y Lam, Ellie E. Prepas, et Steve E. Hrudey. (2000) Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57:1584-1593.
- Krishnamurthy T, Szafraniec L, Hunt DF, Shabanowitz J, Yates JR 3rd, Hauer CR, Carmichael WW, Skulberg O, Codd GA, Missler S. (1989). Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(3):770-4.
- Kurmayer R, Kutzenberger T. (2003). Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol.* (11):6723-30.
- Lahti, k., J. Rapala, M. Färding, M. Niemelä et K. Sivonen. (1997). Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Research* 31(5):1005-1012.
- Lee Robert E. (2008) *Phycology* (4th edition), Cambridge University Press.
- Lee SJ, Jang MH, Kim HS, Yoon BD, Oh HM. (2000). Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *J Appl Microbiol.* 89(2):323-9.
- Long BM, Jones GJ, Orr PT. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl Environ Microbiol.* 67(1):278-83.
- Lukac M, Aegerter R. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon.* 31(3):293-305.
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264(2):187-92.
- Magalhães VF, Soares RM, Azevedo SM. (2001) Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon.* 39(7):1077-85.
- Mankiewicz-Boczek J, Izydorczyk K, Romanowska-Duda Z, Jurczak T, Stefaniak K, Kokocinski M. (2006). Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods. *Environ Toxicol.* 21:380-387.

Martin-Luna B, Sevilla E, Hernandez JA, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. (2006). Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*. 67(9):876-81. Epub 2006 Apr 4.

McElhiney J, Lawton LA, Leifert C. (2001). Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*. 39(9):1411-20.

Meißner K, Dittmann E, Börner T. (1996). Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Lett*. 135(2-3):295-303.

Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, Rudi K, Jakobsen KS. (2003). Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol*. 185(9):2774-85.

Miura GA, Robinson NA, Geisbert TW, Bostian KA, White JD, Pace JG. (1989). Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR in fasted rats. *Toxicon*. 27(11):1229-40.

Moffitt MC, Neilan BA. (2004). Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol*. 70(11):6353-62.

Mohamed ZA, Al Shehri AM. (2009). Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J Hazard Mater*. 172(1):310-5.

Neilan BA, Jacobs D, Goodman AE. (1995). Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol*. 61(11):3875-83.

Neilan BA. (2002). The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria. *Curr Issues Mol Biol*. 4(1):1-11. Review.

Neilan BA, Pearson LA, Moffitt MC, Mihali KT, Kaebernick M, Kellmann R, Pomati F. (2008). The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. *Adv Exp Med Biol*. 619:417-52. Review.

Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K, Börner T. (1999). Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol*. 181(13):4089-97.

Nishiwaki-Matsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K, Watanabe MF, Fujiki H. (1991). Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Jpn J Cancer Res.* 82(9):993-6.

Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol.* 118(6):420-4.

Oberholster PJ, Myburgh JG, Govender D, Bengis R, Botha AM. (2009). Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(4):1177-82.

Oh HM, Lee SJ, Jang MH, Yoon BD. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Appl Environ Microbiol.* 66(1):176-9.

Okello W, Portmann C, Erhard M, Gademann K, Kurmayer R. (2009). Occurrence of microcystin-producing cyanobacteria in Ugandan freshwater habitats. *Environ Toxicol.*

Ouahid Y, Pérez-Silva G, del Campo FF. (2005). Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environ Toxicol.* 20(3):235-42.

Ouellette AJ, Handy SM, Wilhelm SW. (2006). Toxic *Microcystis* is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities. *Microb Ecol.* 51(2):154-65.

Paerl Hans. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. *Adv Exp Med Biol.* 619:217-37. Review.

Pan H, Song L, Liu Y, Börner T. (2002). Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Arch Microbiol.* 178(6):421-7.

Patel JB. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 6(4):313-21.

Pearson LA, Moffitt MC, Ginn HP, B A N. (2008) The molecular genetics and regulation of cyanobacterial peptide hepatotoxin biosynthesis. *Crit Rev Toxicol.* 38(10):847-56. Review.

Pearson LA, Hisbergues M, Börner T, Dittmann E, Neilan BA. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol.* 70(11):6370-8.

Pegram RA, Humpage AR, Neilan BA, Runnegar MT, Nichols T, Thacker RW, Pflugmacher S, Etheridge SM and Love AH. (2008). Chapter 15: Cyanotoxins Workgroup Report *Adv Exp Med Biol.* 619: 317-81. Review.

Prescott LM., Haley JP. et Klein DA. (2003). *Microbiologie*. De Boeck Université, 2^{ème} éd. Française, traduit de la 5^{ème} édition américaine (2002).

Rao PV, Bhattacharya R. (1996). The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology.* 114(1):29-36.

Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M, Rouhiainen L, Vaitomaa J, Börner T, Sivonen K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(2): 568-573.

Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, Lepistö L, Rintala J, Mankiewicz-Boczek J, Sivonen K. (2006). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl Environ Microbiol.* p. 6101-6110.

Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemelä SI. (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol.* 63(6):2206-12.

Robert C. (2004) Bilan de la qualité de l'eau potable au Québec (1995-2002). Rapport de Direction des politiques de l'eau, Direction générale des politiques (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs).

Robert C, Tremblay H., DeBlois C. (2005) Cyanobactéries et cyanotoxines au Québec : suivi à six stations de production d'eau potable (2001-2003). Direction générale des politiques (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs).

Robert C. (2008) Résultats de cyanobactéries et cyanotoxines à sept stations de production d'eau potable (2004-2006), rapport de Direction des politiques de l'eau, Direction générale des politiques (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs).

Roeselers G, Stal LJ, van Loosdrecht MC, Muyzer G. (2007). Development of a PCR for the detection and identification of cyanobacterial *nifD* genes. *J Microbiol Methods*. 70(3):550-6.

Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. 70(2): 686-692.

Sabart M, Pobel D, Briand E, Combourieu B, Salençon MJ, Humbert JF, Latour D. (2010). Spatiotemporal variations in microcystin concentrations and in the proportions of microcystin-producing cells in several *Microcystis aeruginosa* populations. *Appl Environ Microbiol*. 76(14):4750-9.

Saker ML, Fastner J, Dittmann E, Christiansen G, Vasconcelos VM (2005). Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *J Appl Microbiol*. 99(4):749-57.

Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*. 20(3):275-87. Review.

Sevilla E, Martin-Luna B, Vela L, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. (2008). Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ Microbiol*. 10(10):2476-83.

Sigee D.C. (2005) *Freshwater microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. Chichester, John Wiley and Sons.

Sivonen, K., Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus and J Bartram (eds.), *Toxic Cyanobacteria in water*, E & FN Spon, London, pp 41-111.

Suda S, Watanabe MM, Otsuka S, Mahakahant A, Yongmanitchai W, Nopartnaraporn N, Liu Y, Day JG. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52(Pt 5):1577-95.

Tanabe Y, Sano T, Kasai F, Watanabe MM. (2009). Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol Biol*. 9:115.

Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*. 7(10):753-64.

Tooming-Klunderud A, Fewer DP, Rohrlack T, Jokela J, Rouhiainen L, Sivonen K, Kristensen T, Jakobsen KS. (2008). Evidence for positive selection acting on microcystin synthetase adenylation domains in three cyanobacterial genera. *BMC Evol Biol.* 8:256.

Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis.* 17(6):1317-21.

Utkilen H, Gjølme N. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 61(2):797-800.

Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Møkelke L, Sivonen K. (2003). Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for microcystis and anabaena in lakes. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7289-97.

Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. (2007) Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res.* 51(1):7-60. Review.

Vareli K, Pilidis G, Mavrogiorgou MC, Briasoulis E, Sainis I. (2009). Molecular characterization of cyanobacterial diversity and yearly fluctuations of Microcystin loads in a suburban Mediterranean Lake (Lake Pamvotis, Greece). *J Environ Monit.* (8):1506-12.

Watanabe MF, Oishi S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl Environ Microbiol.* 49(5):1342-4.

Walsby AE. (1994) Gas vesicles. *Microbiol Rev.* 58(1):94-144. Review.

Wickstrom ML, Khan SA, Haschek WM, Wyman JF, Eriksson JE, Schaeffer DJ, Beasley VR. (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicol Pathol.* 23(3):326-37.

Wilmotte, A. and M. Herdman. (2001) Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. Pages 487-493 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition.* G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (eds.) Springer-Verlag, New York.

Woese CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51(2):221-71. Review.

Xu Y, Wu Z, Yu B, Peng X, Yu G, Wei Z, Wang G, Li R. (2008). Non-microcystin producing *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters. *Environ Pollut.* 156(1):162-7.

Yan H, Pan G, Zou H, Song L, Zhang M. (2004). Effects of nitrogen forms on the production of cyanobacterial toxin microcystin-IR by an isolated *Microcystis aeruginosa*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 39(11-12):2993-3003.

Yeager CM, Kornosky JL, Morgan RE, Cain EC, Garcia-Pichel F, Housman DC, Belnap J, Kuske CR. (2007) Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N₂-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(1):85-97.

Yoo, R.S., W.W. Carmichael, R. C. Hoehn, S.H. Hrudey (1995) Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins : A Ressource Guide. American Water Works Association, 229p.

Young FM, Thomson C, Metcalf JS, Lucocq JM, Codd GA. (2005). Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *J Struct Biol.* 151(2):208-14.

Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 8(1):1-37. Review.

Zegura B, Sedmak B, Filipic M. (2003). Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon.* 41(1):41-8.

Zegura B, Zajc I, Lah TT, Filipic M. (2008). Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon.* 51(4):615-23.

ANNEXE

CARTE DU GÈNE *mcyE*

Gène *mcyE*, séquencé à partir du génome de *Microcystis aeruginosa* (GenBank, Version AB032549.2). Apparaissent sur cette carte, surlignée en gris foncé, la séquence amplifiée par les amorces HEPF/HEPR, et en gris clair, la séquence amplifiée par les amorces *mcyE*-F2/*mcyE*-R4.

```
1 atgggttgaga gtatagatta caaaaaatta atggcaacga ccttaagcaa aatggagggtc
61 atgcaggctc gtatcaatga attagaaacg agacaaagtg aatctattgc ggtgggttggg
121 atggccttgtc gttttcctgg aggtattaat tccccagaaa agtattggag tttttgtcaa
181 gccgggcttg atgctatagt agaagtcctt aaaagccgtt gggtatatctc aaaactgtat
241 tctcaagaac caactttagg aaaaatgaac accgcttatg ggggatttct tcaagagaat
301 atcacagaat ttgatgctcg tttcttttcg atttcagcaa aagaagcagc ctccatggat
361 cctcaacaaa ggttactctt agaagttgct tgggaagcgt tagaaaatgc caatttacct
421 ctgaaaaatt tagccgataa taaagtaggg gtatttgtgg ggattactag cattgatcat
481 gccctgaagg tttacggtac aaactatgat caaattgact ctttttttgg cagtggcaat
541 gctetaagcg ccgcccggcg aaggctctct tattttctca atcttcacgg tccttgtctc
601 tccattgatg cagcctgtgc atcctcatta gcagccgtcc atcaggggat tcgtagcctg
661 agaaatcggt aatgtgaact cgcttttagtg ggtggggtaa acctcatttt agaaccgcga
721 attacgatta gtcttttctc gtcgggaatg atgtcccccg atgggcgttg caaaaccttc
781 gatgcctctg ctaacggata tgtgcgaggg gaaggctgtg ggggtttaat cttaaaaact
841 ttatcagaag cccagaaaaa cggggatcac attcctgccc tgttgcgagg ttcggcggtg
901 aatcataatg gggctgctgc cggtttaacc gtaccagtg gacccgccc gcaagaattg
961 ctccgtcaag ctctagttag tgccagaata gtcctgaag atgtcagcta catagaagct
1021 catggcacag gcacttcttt aggagatccc atcgaattga atgccattgc ctcatgttat
1081 ggaaagcgct ccgaccctct ttatgtcgcc tcagtcaaaa ccaatatcgg tcactctgaa
1141 gccgcggtg gcattggcgg aataatcaaa acaatttctg ttcttcaaca gggtgaaatc
1201 cctcccatc ttcacttcca aaccctaat cctctgatta attgggaaga ccattcctatt
1261 aaaattccta ctcaaaatat accttggccg aataacaata aagtcccat agctggggta
1321 agttcttttg gattttctgg cacaaatgcc catgttatg ttcaacaagc acccgtcagc
1381 aaaatctcag aaattcaaca acaacttccc agtcactctt taaccctttc agcccacaac
1441 aaaaccgctt taaaagaatt agccaaacgc ttccataccc tcctagaatc tcgtcctgaa
1501 attggagata tttgttatag tgcagccgtc gggaggatag atttacctga acgtttagcc
1561 attgttggcg atacttgtcc agaattacaa caaagattag ccgcttttgc tgaagaaaaa
1621 ccacttgatg atttgacttt ttatcaacgt ttacatcgg aaaaatcccc taaaatttgt
1681 tttcttttta cagggcaagg ggcttgttat cctggcatgg ggcatcaact atatcaaaact
1741 cagccgacat ttcgtcaata tattgatcaa tgtgccgaaa tattgtcgaa gtatttagac
1801 catcctttta ctgaaatatt atttggtgaa cagaccgatt tactcaatca aactgcttac
1861 gctcaaccgg ctatatctgc cctagaatat tccctaacaa tgctatggaa atcctgggga
1921 attaccccca gtttactgat tggccatagt gtgggagaat atgtagcagc ttgtatcgca
1981 ggagtattta gcttagaagc tggactcgcc ttagttgtca agcgggggca attaatgcaa
2041 accacaacct ccgggaaaat ggcttcaatt tttgctgatg aagagacagt aagttcccta
2101 attaaaaatt atactcaaac agtttcaata gctgcaatta atcacctca acagatttgt
2161 attgctggag aaagtgccag cattgaggaa gttattagta cctgcaaaaa gcaaaaaatt
2221 ccgctcaaat atcttcccg tactcaggct ttccattccc ctttaatgga gccaatttta
2281 aaagaatttg aaaaagaggc tcgtcaaat tattatcaac gcccccaat tctgtactt
2341 tcaggacttg atggagagct ttagaaaaat gcaccagatg ccgcttactg gagtaaacaa
2401 tgcgagaaac cagtaagatt tttgtcgagt ttaataaccg ctttcaacaa gggatataac
2461 ctatttttag aagtgggacc aagaccaata ctagcagaac aaggtcgtcg ttataaagat
2521 gaggtcatct ggttaagttc tctcaatcgt ggcttagata actggcatac aattctttca
2581 gccttggcac aactctacct aaatgggtgca cctttcaatc cagaacaatt caatcgaaat
2641 tatggctata aaaaagtcag attgccgaac tatcccttcc aaaggaaacc tttccaattt
2701 cagcctaata ctcgaaacga aaatcagagc attgacaaaa tattcctaga cgcacaaacc
2761 tctaacctta ccgataccga aaccacagtt ttcaatatgc aaaaacatca acaggaaatc
```

```

2821 cgtaatcaat taaaatcaat tttggcttta cttctgaaag aagatgagaa cgatctgcc
2881 gaggatgaga cattaactaaa cttaggagca gactcaatta tcttgactga cttttctcgc
2941 aaagtcgaag aaaaaatttca agtcaaagtg aaaaatagatc aactctttac cgatttacaa
3001 actcttgctg atattgccga atacctctgc caatttgtca acgaaaaacc cttagaaaat
3061 gcttcagaaa taacaactaa agttatcaat gatgagacag aattaagcaa ttatttgcaa
3121 gtcattgagc aattgcaacc catcgctaca gcctatatca tcagggcctt agagtcctta
3181 gggaaaaaaac ttaatcaagg ggaacaatgg acaatagaaa ccctaagaca aaccttacct
3241 gttgctcgta aatatcacat tttgctcaat cgttatattgc aggattaga gcaagcta
3301 gttcttcaca atcaaggga tatttggtact gtcaaaaact tgcctgagtc tttttcctta
3361 ccccaagccc tacaaaagct agaaaaaact tgtccatctg caaaaacctga attagaaatg
3421 ttgcaacgct gcggcgaaaa tttagcggaa gttctcaagg gaaatataga ccccttgaca
3481 ttaattttcc cagaagggtc cgttgctcat gcagaaagta tttatggaaa ttctcccgt
3541 tctcgattga tgaatcaacg agtcgcccaa gctattaacc agattttaac caacttttct
3601 aatagtgatc gcccttatca aattctcgaa ataggaggag gaactggtgc tacttcagaa
3661 gcaattcttc accacttaaa cctcgatcat gtcacttatt ctttttagcga agtttctccc
3721 ttcttactgc atcaagctag gcaaaaattt cagaaaaaat ataacctaaa ctttcatcaa
3781 ctagacattg aaaagtcccc catttctcag gggatacctg ctctgaatta tcatattggt
3841 gtggccgcta acgtccctca tgcgactcga aatattacag aaactctaac ccatattcgg
3901 gaactgctgc gccccggtgg ttacttagtt ctctcgaaa ccgtagaaaa taactcatgg
3961 ctgaatttaa cctttggatt aacccccgga tgggtggcgt ttcaggatca acaattacgc
4021 tcagatacac ccttattaag ggggtgaaat tgggtgttccg ttttaaaaag ttgtgggttt
4081 gctacggcga atagtctctc taaacaaaac aatattccca ttaacaatgg ccaagaatta
4141 attcttgctt gtgtgccaga tgaacccctc tcaattcctg caattcctaa gttcactgtc
4201 tctggtgaaa gctccggtaa agaagcctta atgatggctc aattacaatc tttaaaagac
4261 ctaaaagacc tccatgagaa aaccattatc aagcaattag aagttcttca aactgcccct
4321 gttttcccca gtatagcccc cgaaatatta acgaatcaga ctcaaatcat tcctacccaa
4381 agctctaaga cagaaactta ccttcgggtt tctcaagaga agcccaaatc tcctgagaaa
4441 cctagtcttc ccaatttaaa ccccttagct ttaaagctga ctgagaacaa atccttaacc
4501 gaacaacaac aagcctttat tcaaaattta cagagtattt ataaccagaa aaccgccaaa
4561 tcaaaaagcct attcacaaaa tagccgtaag acaatgggtg atgttaaac gactattgac
4621 tccgcgatgg ccttaaaaga atttcaatat cccattgttt cagaatctgc tcaaggggct
4681 tattttaagg acattgatgg caataattat attgacttag ctatggggtt tggggtaac
4741 ttttttgggc atagtctga ttttgtcatt aaagcagttc aagaacaaat gaatcgagga
4801 ataggcttag gaatgcagtc aaatctggcc gccgaaaccg ccgctttaat tagtgaatg
4861 ggccgagtcg aaagagtcgc ttttagtaat acgggaaccg aggcgattat ggcggctgtt
4921 cgcattgctc gctccgggac aaaacgtcaa aaatcgtta tgtttgcccg ctctatctat
4981 ggaacttttg acggcatctt agcacagata ggagaagata aaaccactgc tcaaccctta
5041 agtctagga cccctttagg aatggttgaa gacataatag tcttgagtta tggagttag
5101 gaaagcctcg atattattgc tactcatgct gatgatttag ccgcgctatt agtcgaacca
5161 gttcaaaagtc gcaaacccga tttacagcct caagaatttc tgcaaaaact acgacaaata
5221 acccataaaa aagggatcac actcattttt gatgaaatta ttaccggctt tcggattgct
5281 ccgggaggag cgcaagaatg gttcaatggt gaagctgata tagtcattta tggtaaggcc
5341 attggaggag gtttaccat tagtatgac tgcggtaaa cagatttctt agataccgtt
5401 gacggcggtt tctggcaata cggagatgac tctcatcccc aaaccgagtt aaccgctttt
5461 gggggaactt tttgtcgtca tcttttagcc cttgctgctt gtcgtgctgt gcttttcat
5521 cttcgggaaa acagtccaac gattcaagaa aaagtgaatc aattaactca tcgattagcc
5581 accgaagtta atcagttttt tcaagaaata ggcattccga ttcgggttgt taattttggc
5641 tctttattcc gctttgaacc ttttgagct tatagtatct tcttacaacc catcgaatta
5701 cccctctttt attacctatt aaatcttaaa ggaatctaca catgggaaaa acgagtttgt
5761 tttctctcca cctgccatc taataaagat atagacaaag ttatagtagc cgtcaaagaa
5821 gcgattacgg aattacagca agctggtttt tttgctaatt ctaaacgccc tcaagtcaag
5881 aaagaagaaa aaaagcccct ctctgaagat gaagatggta ggggacatct accatcttta
5941 aatcagtcct tcccaccag tgaagctcaa cgtcaacttt ggttattagc tgaattagac
6001 cgtaatgctt cagcatccta taacgtcaca acatctctag aattactagg ttcttttagat
6061 gtttacattt tagaaaaaac gattaatcaa gttattaatc gccatgaagc tttgccaacc
6121 aaaattatag aacaaggaga attacaggaa gttgtcaatg aagttaacat taaattaaac
6181 ctcattgatt ttaaggatga agataatccc gaagcgacgg ccttagcgtt acgatctcag
6241 ttttcccaaa aaccctttga cctgtcgatt gctcctttat ttgctgtgat ttaaatgcgc
6301 ttaaaacctg accattatct gctctcttta aaaactcatc atattgtggc agatgggttg
6361 tcaataggat taattttgca ggaaattggg caactttatt catcccaaaa taacacaact
6421 aaagagggtc tcacaccacc gatgcagttt cggcaatatt taaccttgcg agcgcgaagag

```



```

6481 acgcaaagtc cacaaatgtt agagcatcgg gatttttggg tgaaaaccta tcaggaagat
6541 ctcccaacct ttgagcttcc caccgacttt ccccgccccg ccgttaaaac ctacactggc
6601 ggacaagaaa gtcaagtcac tccctctgaa gttgggcaaa atttgcagaa agtaggacgc
6661 aaaaataaag ctacattatt tatgacgatg ttccgcccgt atactgcttt ttgctgcga
6721 atttctggcc atagggattt agtcattggg attcctattt ctgggcgaca aatagaaggt
6781 agtgacaact tagtaggctt ttgttctcaa tttttacccc tgccgataca agtcgatgct
6841 accacctctt ttattgaaca tttaaacac actaaacaaa ccctgatcga cgcttttcgc
6901 catcagagtt atactttaga ggatttatta gcagctttac aattacctag agatttttct
6961 cgttctcttc tcatttcggg atcttttaac atggatccta gtttaactct gcctgaattt
7021 aaagacttaa aagtatcctt gccaccgtca ccgattgggt atacaccttt tgatctagga
7081 ttttaacctaa ttgaacttaa tgataacctc attatttact gcaattacaa tacagaactc
7141 tttaaaaaag agacaattaa acaatttatt gaaagctttg aaattttgct gaggggaatc
7201 attgacgatg ctaatcatct tctttatcag ttacctttat taacccagc ccaacaagag
7261 aagttactca gacaattaa cggaaaaact cgcaaacctc ctgagaaagc caccatcatt
7321 gatgactttg tagctcaagt taaattaacc cctaagtctc ccgccttaat tgcaggaaaa
7381 attaacctta gctatcaaga attaaatgaa aaagtcaatc gtcttaccct ttatttaccg
7441 caggaaatct agctaggtgt aggaaaaagt attgggggtc tgctccagcg tgatcacac
7501 ttaatcatcg ggattctggc tacttttaaa actggagcga cttacgttcc tatagactct
7561 caatatcttc acagtcgcat tgagtttatt taaaagata gtggctgtca tgtttgccta
7621 acggagagta attttatctc taagttacct gaaaaaatgc agaaaatttg cttagataaa
7681 attgatccta ttgttgaaaa atatgacaaa gatgagccta aaatatctcg caattctagc
7741 caaactgctt atattttcta tacttcaggt tcaactggta atcctaaagg agtcatgggc
7801 tgtcacatct caattttgaa tgttattcaa agcttacgac ttacttttga tttagataaa
7861 catcctgaat ggcgctatat ttccacagct gccgttactc atgatccatc tattcgtaat
7921 atttttctcc ccttaacctat aggtgcatcc ctatatatgt acgaaataaa atatatagga
7981 catttggttt ctttcctaca agaaaatcaa attaatgccc tacatactac cccctctatc
8041 tatcgagaaa tcttagggct actgaaccg ggagaaacca ttccagctt aaaatatatc
8101 tcggtaggag ggaaaaaatt agatcgggaa actgccttag ctttacggaa acgttttcgc
8161 gcagaaattg ttagcaatgt ctacggatct acagaaactt gtgtaggagt atcccagtat
8221 gaaatcaagg aaaacttaga cagcgaaatc cccctcggtc aagttttcca taacaatcgc
8281 ttaggggttc ttgatgaatt taataatccc gttccctccc atgtaatcgg cgaaatttgt
8341 gtagaagggt ccgccctagc atcgggttat cataaccaac ccgaaatgac tcaagaaaaa
8401 tttaaacccta gctttcttga tgagacaaaa actctcttta gaaccggcga tttaggcaag
8461 caaactgctc cgggtatcat tgagtttatg ggacgaaaag ataatacagt taagggtcaat
8521 ggttatcgaa ttgaccccg agaaaattgaa tatcaattga ctcggtatgc tcccattgaa
8581 agagcgattg tttaccctg tcaagttaat aatcaaacctc aattatctgc ttactgtcaa
8641 acagacaaaa ccttagaagt tgctgagatt cgagaattac ttgccaaatt tttaccagtt
8701 tatatgatcc cgagttactt tattttttta aagcaattcc ccttaactcg acatggaaaa
8761 cttgacctgc actccctgag agaactcaga gaaactggta aatctctggt gaattctaatt
8821 tacgttgcac cccgtaatca tttagaatcc aatctcggtt gtatctggga aaaaattctc
8881 tctaaacatc ctatcggtat tttgataac ttctttgaaa ttggcggtca ttctctactc
8941 ttatcaaggg ttgtaaccgg ggttcataaa gaactaaatg tatccgtaaa attggctgac
9001 ttctttaaag ttccaacctat tgctggattg gcgactttaa tctcccagac tcaatacaat
9061 tatcaagaac ccatttcggc aattcccccc caaaaatcct atccgatgct tcatggtcag
9121 cgctgctctt gggtctttaga attcctagat caaaatcata atgcctacgg aatgccaggt
9181 gcttatcaat tcaagggcaa tctcaatatt gatgcttttg aaaatgcctt tcaacagtta
9241 attcaacgcc atgaaatttt gcggacaacc tttactttta tcaataatca accccgtcaa
9301 gttgtccata atcaaatgaa cttgtcatt aaacaaatag acctgacagc ttatgttagc
9361 acagaacaag aaaacctgat cgaagaatca atcagccata atgcaaaaac gacttttgat
9421 ttagaagtgg gaccgttact taaagttaac ttacttaaac taagtcaaga gaattacatc
9481 gtcttgttta atatgcacca tatcattttt gatggttggg cagcaggggt ttttaattaaa
9541 gattttctca cccattatca cgcctatgga caagaaaatt cccaattaat gccccctctt
9601 agaattcatt ataaagacta tacttcttgg caagaaagtc aattagagac cttgaaactt
9661 caaggtcaac gggattactg gttagctaaa ttaactccag ttcctgttcg tcttaactta
9721 cctgttgatt atccgcgccc acctgttaaa agttttcagg gaaatacaat tacatggcaa
9781 cctgaacccg aattgatcga tacttttgag aagttagtta aagcacaaag agccagttta
9841 tttatgggtt tagttagttt ggttaagagt tttctattcc gttatactga gcaaaatgaa
9901 attacaatag gctctgctat cgctggcaga aatcatcctg atttagaaga tcaaatcgga
9961 ttttatgtta acactctcgt cctcgccgat cagataacag atcacgacag ttttacggat
10021 gtccttagca aagtaaaaaa aaccacttta gaggttatg atcatcaaga ctatcccttt
10081 gatcagatcg tatctgattt gaatttacia cgagatccta gccgtaatgc tctctttgat

```

```
10141 gttgcaatcg ttctgcaaaa taatcaaaaat gtagatctgg ccttggacgg aattacagtt
10201 aactccattg acccaaaaat gattaccgct aaatttgatt tagaatttat ctttgttgag
10261 gaagaagaac tttatctcaa gctaattctac aacacagata tatttatcca tgagcgaatt
10321 ttattgatca tagatttggt caaaaactgg ctagagcaag ttttaaatt tgcccatgaa
10381 ctttgataa acttatcctt agcttctca gaaaatctta ctcaagaggg gcaggaactg
10441 ttcacagaag actttaattt ttag
```